

Aktivität lichtaktivierter Proteine adsorbiert an funktionalisierten nanoporösen Aluminaten

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV - Chemie und Pharmazie -
der Universität Regensburg



vorgelegt von
CHRISTIAN HORN
aus Warendorf

2005

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Dezember 2001 bis Mai 2005 unter der Leitung von Prof. Dr. C. Steinem am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV – Chemie und Pharmazie – der Universität Regensburg.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht im Juni 2005.

Tag der mündlichen Prüfung: 27.06.2005

1. Prüfer:	Prof. Dr. C. Steinem
2. Prüfer:	Prof. Dr. P. Hegemann
3. Prüfer:	Prof. Dr. J. Daub
Prüfungsvorsitzender:	Prof. Dr. M. Liefänder

it took years to climb that hill
and now we look up to the mountains
but as high as you might climb there's still
something we should not forget
it takes seconds to fall - seconds to fall

Fury in the Slaughterhouse

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	11
1.1	Biologische Membranen	11
1.2	Festkörperunterstützte Lipiddoppelschichten als Modelle für Bio- membranen	12
1.2.1	Lipidmembranen auf planaren Oberflächen	13
1.2.2	Lipidmembranen auf Polymerkissen / <i>tethered membranes</i> .	14
1.2.3	Porenüberspannende Lipidmembranen	15
1.2.4	Modellmembranen zum Studium lichtaktivierter Proteine und Reaktionen	17
1.3	Bacteriorhodopsin	18
1.4	Chlamydomonas reinhardtii	21
2	Zielsetzung	25
3	Methoden	27
3.1	Impedanzspektroskopie	27
3.1.1	Physikalische Grundlagen	27
3.1.2	Auswertung der Spektren	29
3.1.3	Elektrische Beschreibung festkörperunterstützter Membranen	30
3.1.4	Elektrische Beschreibung porenüberspannender Membranen	31
3.1.5	Darstellung von Impedanzspektren	32
3.1.6	Experimenteller Teil	33
3.1.6.1	Meßmethode	33
3.1.6.2	Meßaufbau für Goldelektroden und geschlossene Poren	34

3.1.6.3	Meßaufbau für geöffnete Poren	34
3.2	Dissipative Quarzmikrowaage-technik	35
3.2.1	Piezoelektrizität und akustische Sensoren	36
3.2.2	Physikalische Grundlagen	36
3.2.3	QCM-D-Technik	38
3.2.4	Experimenteller Teil	40
3.3	Messung der Protonenpumpaktivität von Bacteriorhodopsin . . .	41
3.3.1	Messung lichtinduzierter Protonenströme	41
3.3.1.1	Aufbau bei Adsorption an nano-BLMs	42
3.3.1.2	Aufbau bei Adsorption an Goldelektroden und ge- schlossenen Poren	43
3.4	Biochemische Methoden	44
3.4.1	Isolierung der Purpurmembra- nen aus <i>Halobacterium salinarium</i>	44
3.4.2	Vorbereitung der <i>Chlamydomonas</i> -Zellen	45
3.4.2.1	Kultivierung	45
3.4.2.2	Umwandlung in Gameten	46
3.4.2.3	Photoselektion	46
3.5	Präparative Methoden	48
3.5.1	Herstellung von porösem Alumi- nat	48
3.5.1.1	Grundlagen der Herstellung poröser Aluminate	48
3.5.1.2	Herstellung von porösem Alumi- nat	52
3.5.2	Präparation von <i>self-assembly</i> - Monoschichten auf Goldober- flächen	54
3.5.3	Präparation von nano-BLMs	54
3.5.4	Präparation von <i>painted mem- branes</i>	55
3.5.5	Präparation von Polyelektrolyt- Schichten	55
3.5.6	Adsorption von Purpurmembra- nen auf funktionalisierten Goldelektroden/porösen Alumi- naten	56
3.5.7	Präparation von Bacteriorhodopsin- haltigen Vesikeln nach der <i>reversed phase</i> Methode	56

4	Ergebnisse	57
4.1	Theoretische Betrachtungen zur „aktiven Fläche“	59
4.2	Adsorption von Membranfragmenten	64
4.2.1	Adsorption an geladene Thiolmonoschichten	64
4.2.2	Adsorption an Polyelektrolyt-Schichten	65
4.2.3	Adsorption von Purpurmbranen an <i>painted membranes</i>	69
4.3	Messung der Aktivität lichtaktivierter Proteine	71
4.3.1	Bacteriorhodopsin in Purpurmbranen	71
4.3.1.1	Aktivität auf planaren Goldoberflächen	72
4.3.1.2	Aktivität auf porösem Aluminat	81
4.3.2	Channelrhodopsin I und II in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	101
4.3.2.1	Aktivität auf planaren Goldoberflächen	102
4.3.2.2	Aktivität auf porösem Aluminat	103
5	Diskussion	107
5.1	Oberflächenmodifikation mit Aminoalkanthiolen	108
5.2	Oberflächenmodifikation mit Polyelektrolyt-Multischichten	114
5.3	Oberflächenmodifikation mit Lipidmembranen	118
5.4	Photoströme <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	123
6	Zusammenfassung	125
7	Summary	127
	Literaturverzeichnis	129
8	Anhang	143

1 Einleitung

1.1 Biologische Membranen

Biologische Membranen umgeben alle lebenden Zellen und grenzen diese somit von der Umwelt oder benachbarten Zellen ab. Desweiteren sind die Organellen einer eukaryotischen Zelle wie z. B. Lysosomen oder Mitochondrien von einer oder zwei Membranen umgeben, so daß in sich geschlossene Reaktionsräume entstehen. In diesen können die vielfältigen biochemischen Reaktionen unter unterschiedlichen Bedingungen, wie pH-Wert oder Ionenkonzentration, ablaufen. Hauptbestandteile biologischer Membranen sind Lipide, Proteine und in tierischen Zellen das Steroid Cholesterol. Lipide bestehen aus hydrophoben Kohlenwasserstoffketten und einem hydrophilen Kopfbereich. Aufgrund dieser amphiphilen Struktur lagern sie sich in einem wäßrigen Medium spontan zu Lipiddoppelschichten zusammen, um die Berührungsflächen der hydrophoben Bereiche zum Wasser zu minimieren. Dies wurde zum ersten Mal von Gorter und Grendel festgestellt^[1], die die Lipide von Erythrozyten isolierten und aus deren Fläche auf einer Filmwaage schlossen, daß die Zellen von einer Lipiddoppelschicht umgeben sein müssen.

Eingebettet in diese Lipidmatrix sind integrale Membranproteine, die sich in der Membran lateral bewegen können. Periphere Proteine sind an die Membran angelagert. Singer und Nicholson^[2] stellten 1972 das sogenannte *fluid mosaic* Modell für die Membranstruktur vor. Darin bilden die Lipide ein zweidimensionales Lösungsmittel für die Membranproteine. Diese bestimmen maßgeblich die Funktion. In letzter Zeit gibt es aber im Rahmen der *raft-Hypothese* Hinweise darauf, daß auch die Lipidzusammensetzung Struktur und Funktion der Membran beeinflusst^[3, 4].

Die primäre Funktion einer biologischen Membran liegt in der Einschränkung der Permeabilität für wasserlösliche Substanzen. Der gezielte Transport für den Stoffwechsel oder den Aufbau von Membranpotentialen wichtiger Substanzen wird durch spezielle *Carrier*-Moleküle oder Ionenkanäle und -pumpen, wie das in dieser Arbeit verwendete Bacteriorhodopsin, gewährleistet. Weitere Funktionen von Membranen sind ihre Rezeptoreigenschaften. Diese werden von Glycolipiden oder -proteinen ausgemacht, die z. B. Hormone oder Antikörper binden können.

1.2 Festkörperunterstützte Lipiddoppelschichten als Modelle für Biomembranen

Seit dem der molekulare Aufbau der Zellmembran bekannt ist, wird versucht, dieses komplexe System in Form von künstlich hergestellten Lipiddoppelschichten zu imitieren. Die Motivation liegt zum einen darin, die Vielfalt an Lipiden, Proteinen, und sonstigen Membranbestandteilen der natürlichen Membran zu reduzieren, um in einem einfacheren Modellsystem Informationen über einzelne Bestandteile des Gesamtsystems zu erlangen. Zum anderen stellen viele Membranproteine, vor allem Ionenkanäle und Transportproteine potenzielle Targets in der pharmazeutischen Forschung dar. Ein wünschenswertes Ziel in der Zukunft ist es daher, auf der Basis von Modellmembransystemen *Highthroughput*-Verfahren zu entwickeln, um entsprechende Wirkstoffe zu testen. Viele Membranproteine sind elektrogen, d. h. sie bewirken einen gerichteten Ladungsfluß über die Membran, der als Strom meßbar ist. Dies ist nur in Modellsystemen möglich, die zum einen in einen externen Stromkreislauf integriert werden können und zum anderen eine Vorzugsorientierung der Proteine erlauben. Vesikuläre Systeme z. B. scheiden daher für die Charakterisierung der elektrischen Eigenschaften von Membranproteinen aus. BLMs (Black Lipid Membranes) erfüllen die bis dahin genannten Anforderungen. Dementsprechend groß ist die Vielzahl an Studien, die mit diesem System seit seiner Einführung durch Müller und Rudin^[5] 1963 zur Charakterisierung von Membranproteinen durchgeführt wurden. Ein großer Nachteil der BLMs

ist jedoch ihre mangelnde Langzeitstabilität und die Anfälligkeit gegen mechanischen Störungen. Daher wurden verschiedene Modellsysteme entwickelt, die auf der Immobilisierung von Lipiddoppelschichten auf Festkörpersubstraten basieren. Dies sollte ihnen die nötige Stabilität verleihen. Daneben erlauben diese *solid supported membranes* (SSMs) die Anwendung oberflächenanalytischer Techniken wie der Rasterkraftmikroskopie^[6], der Oberflächenplasmonenresonanz^[7] oder der Quarzmikrowaage^[8,9].

1.2.1 Lipidmembranen auf planaren Oberflächen

Die Langmuir-Blodgett-Technik (LB-Technik) ist die älteste Methode, um eine Lipiddoppelschicht auf einem Festkörper zu immobilisieren^[10]. Dazu wird zunächst eine amphiphile Substanz auf einer Wasseroberfläche gespreitet. Anschließend wird ein Substrat mit einer hydrophilen Oberfläche bei konstantem Oberflächen- druck vertikal aus dem Wasser bewegt, wobei die amphiphilen Moleküle mit dem hydrophilen Ende am Festkörper haften bleiben. Auf dieser dann hydrophoben Oberfläche kann durch erneutes Eintauchen eine zweite Monoschicht abgeschieden werden, so daß eine Lipiddoppelschicht entsteht. Die Abscheidung der zweiten Monoschicht ist jedoch nur für spezielle Lipide möglich. Geeigneter ist dann die Langmuir-Schäfer-Technik^[11]. Dabei wird das hydrophobe Substrat horizontal auf die Wasseroberfläche mit den amphiphilen Molekülen aufgelegt und nach etwa 10 s durch die Oberfläche ins Wasser gestoßen, wobei sich eine Lipiddoppelschicht bildet.

Eine andere Möglichkeit eine erste hydrophobe Monoschicht auf einem Festkörper aufzubauen, besteht in der Chemisorption von Alkanthiolen oder Thiolipiden auf Edelmetalloberflächen oder von entsprechenden Silanen auf hydroxylierten oder oxidischen Oberflächen^[12] in einem *self-assembly*-Prozeß. Die zweite Monoschicht kann nun wieder mit Hilfe der Langmuir-Schäfer-Technik aufgebracht werden. Alternativ kann die Lipiddoppelschicht auch durch Vesikelspreiten erzeugt werden. Die thermodynamisch günstige Verringerung der Kontaktfläche zwischen wäßriger Phase und der hydrophoben Schicht begünstigt in diesem Fall das Sprei-

ten der Vesikel^[13]. Eine dritte Möglichkeit, die ebenso auf der Minimierung der Wasser-Monoschicht-Grenzfläche beruht, ist die Herstellung sogenannter *painted membranes*^[14]. Dazu wird eine Lösung aus Lipiden in n-Dekan auf die trockene Oberfläche getropft. Durch Zugabe einer wässrigen Lösung bildet sich spontan die Lipiddoppelschicht. Natürlich sind auch Kombinationen von LB-Technik und den zuletzt genannten Techniken möglich. So kann eine selbstorganisierte Monoschicht als Substrat in der LB-Technik dienen und auf einer hydrophoben LB-Monoschicht können Vesikel gespreitet werden.

Statt Hybriddoppelschichten zu erzeugen, bei denen eine Membran in zwei Arbeitsschritten aus zwei Monoschichten aufgebaut wird, können Doppelschichten auch durch Spreiten von Vesikeln auf hydrophilen Oberflächen wie Glas, Glimmer oder Quarz präpariert werden^[15–18]. Dies wurde zum ersten Mal von Brian und McConnell beschrieben^[19, 20]. Die Anbindung der Vesikel an die Oberfläche erfolgt dabei über ionische und/oder *Van der Waals*-Wechselwirkungen.

Bei allen genannten Techniken ist die Mobilität der Lipide in der unteren Monoschicht aufgrund der Nähe zum unterstützenden Festkörper eingeschränkt. Dies gilt in besonderem Maße für die Hybridmembranen, bei denen die Ankopplung über Chemisorption erfolgt. Die laterale Beweglichkeit der Lipide ist jedoch bezüglich der biomimetischen Eigenschaften ein wichtiges Kriterium für ein Membran-Modellsystem. Ferner verhindert die Nähe zum Festkörper den Einbau oder zumindest die natürliche Faltung großer Membranproteine. Daher wurde mit verschiedenen Strategien versucht, den Abstand der Lipidmembran von der Festkörperoberfläche zu vergrößern.

1.2.2 Lipidmembranen auf Polymerkissen / *tethered membranes*

Die Ansätze, durch Vergrößerung des Abstands von Lipidmembran und Festkörper ein zweites wässriges Reservoir zu schaffen, lassen sich grob in zwei Strategien einteilen. Die erste besteht darin, zunächst ein Polymerkissen auf die

Oberfläche aufzubringen. Das Polymer muß einen hohen Wassergehalt aufweisen, um zum einen die Immobilisierung der Lipiddoppelschichten zu erlauben, zum anderen um eine nicht-denaturierende Umgebung für Proteine sicherzustellen. Neben Dextran- und Hyaluronsäure-Schichten^[21,22] wurden dazu vor allem Polyelektrolyt-Multischichten eingesetzt. Wong et al.^[23] nutzten Vesikelfusion und die LB-Technik, um Lipidmembranen auf einer Polyethylenimin (PEI)-beschichteten Quarzoberfläche zu immobilisieren. Cassier et al.^[24] verfolgten den gleichen Ansatz um Membranen auf Polystyrolsulfonsäure / Polyallylaminhydrochlorid-Multischichten zu erzeugen. Sie konnten durch Fluoreszenzbleichungs-Experimente zeigen, daß laterale Diffusion der Lipide in diesem System möglich ist.

Die zweite Strategie der Abstandsvergrößerung basiert auf der Verwendung von sogenannten „Ankermolekülen“. Diese besitzen einen hydrophilen Teil, der z. B. über Thiolchemie an die Oberfläche gebunden wird, und einen hydrophoben Teil, der in die Lipidmembran insertiert und sie so an die Oberfläche bindet. Die Größe des Reservoirs zwischen Membran und Festkörper kann über die Länge des hydrophilen Spacer-Segments variiert werden. In der Literatur werden solche Membranen *tethered membranes* genannt. Cheng et al.^[25] stellten bei diesem System eine Abhängigkeit der adsorbierten Lipidmenge von der Anzahl der Ankermoleküle fest und sahen dies als Hinweis, daß das hydrophobe Ankersegment tatsächlich in die untere Lipidmonoschicht insertiert. Impedanzspektroskopische Messungen zeigten allerdings geringe Reproduzierbarkeit. Raguse et al.^[26] konnten die Aktivität des Ionencarriers Valinomycin in *tethered membranes* zeigen. Ein Nachteil der Herstellung dieser Art von Lipiddoppelschichten ist sicherlich die Tatsache, daß die Ankermoleküle schwer zu synthetisieren und nicht käuflich erhältlich sind.

1.2.3 Porenüberspannende Lipidmembranen

Ein weiterer Ansatz, die Nachteile direkt an eine planare Festkörperoberfläche gekoppelter Lipidmembranen unter gleichzeitiger Verbesserung der Langzeitstabilität zu überwinden, beruht auf der Präparation von porenüberspannenden Lipid-

membranen, wobei zwischen Substraten mit einer einzelnen Pore und Multiporen-Substraten unterschieden werden kann. Die einzelnen mikrofabrizierten Poren weisen üblicherweise Durchmesser von mehreren Mikrometern auf. Als Materialien wurden Gold/Photoresist, Siliziumdioxid, Siliziumnitrid und Glas eingesetzt. Cheng et al.^[27] konnten nach Aufstreichen von Lipiden über ein $100\text{ }\mu\text{m}$ -Loch die Ausbildung einer Lipiddoppelschicht durch die Insertion von Gramicidin und Alamethicin nachweisen. Osborn und Yager^[28] präparierten eine Membran über einer quadratischen $100\text{ }\mu\text{m}$ -Pore in Siliziumnitrid mit der LB-Technik und wiesen dies mittels Fluoreszenzmikroskopie nach. Fertig et al.^[29] überspannten eine $1\text{ }\mu\text{m}$ große Pore und nutzten konfokale Fluoreszenzmikroskopie als analytische Methode. Ionenkanalereignisse wurden auch von Mayer et al.^[30] beobachtet. Sie stellten porenüberspannende Membranen mit amorphem Teflon als Substrat her. Es wurden Porengrößen von $2\text{--}800\text{ }\mu\text{m}$ präpariert, wobei eine Abhängigkeit des elektrischen Rauschens vom Porendurchmesser festgestellt wurde.

Multiporöse Materialien haben den Vorteil, daß viele Tausend oder Millionen Poren gleichzeitig hergestellt werden. Die Herstellung beruht meist auf einem *self-assembly*-Prozeß oder es werden natürliche poröse Materialien verwendet. Sowohl Ikematsu et al.^[31] als auch Favero et al.^[32,33] verwendeten Polycarbonat-Membran-Filter als Substrate. Sie werden in unterschiedlichen Porengrößen kommerziell vertrieben. Beide gaben Lipidlösungen direkt auf die Filtermembran und induzierten die Ausbildung einer Lipiddoppelschicht durch Zugabe von wäßrigen Lösungen. Ikematsu et al. schlossen aus impedanzspektroskopischen Messungen, daß sich Mikromembranen innerhalb der Poren bildeten. Favero et al. beobachteten die Aktivität von Gramicidin D und Valinomycin in dem System. Poröse Aluminate wurden von Steinem et al.^[34–36] als Substrat verwendet. Membranen, die über Vesikelfusion hergestellt wurden, konnten mit Rasterkraftmikroskopie nachgewiesen werden, waren jedoch wegen des zu geringen Membranwiderstandes nicht geeignet, um Ionenkanalereignisse zu detektieren. Dies war jedoch möglich bei der Präparation von Lösungsmittel-haltigen Membranen, sogenannten nano-BLMs. So konnten die antibiotischen Peptidkanäle Gramicidin und Alamethicin

unter Erhalt der Aktivität inseriert werden^[34]. Ferner wurden auch poröse Substrate auf Silizium-Basis verwendet. Aufgrund der Größe der Poren wurden die Lösungsmittel-haltigen Membranen dort mikro-BLMs genannt. Auch dort konnte durch Insertion von Vpu (1-32), der Transmembrandomäne eines HIV-Peptids, Ionenkanalaktivität festgestellt werden^[37].

1.2.4 Modellmembranen zum Studium lichtaktivierter Proteine und Reaktionen

In der Literatur finden sich zahlreiche Beispiele für die Untersuchung von lichtaktivierten Systemen in Lipidmodellmembranen. Zu den verwendeten Modellsystemen zählen BLMs, festkörperunterstützte Lipiddoppelschichten und vesikuläre Systeme. Vor allem zur Charakterisierung von Bacteriorhodopsin wurden immer wieder artifiziell hergestellte Lipiddoppelschichten, insbesondere BLMs, eingesetzt, um Informationen über die Funktionsweise der Protonenpumpe zu erlangen^[38–41]. Analoge Experimente wurden z. T. auch mit Halorhodopsin, einer lichtgetriebenen Chloridpumpe durchgeführt^[42]. Auf der anderen Seite wurde Bacteriorhodopsin des öfteren eingesetzt, um durch die Aktivität des Proteins die Eignung eines neuen Modellsystems zum Studium von Membranproteinen zu zeigen. So adsorbierten Seifert et al.^[43] zu diesem Zweck Purpurmembranfragmente an *painted membranes*, Puu et al.^[44] immobilisierten bR-haltige Vesikel durch Spreiten auf Platinelektroden und Moran et al.^[45] adsorbierten bR-haltige Vesikel an Phospholipid-imprägnierte Polycarbonatmembranen.

Auch zur Charakterisierung von ATPasen wurden Modellmembranen eingesetzt. Die Aktivierung der Membranproteine erfolgte durch einen ATP-Konzentrationsprung, der durch Photolyse von *caged* ATP ausgelöst wurde.^[43, 46] Eine weitere Anwendung, bei der ein Protein indirekt durch Licht aktiviert wird, wurde von Folgering et al.^[47] beschrieben. Sie inkorporierten den mechanosensitiven Ionenkanal MscL (Mechanosensitive channel of large conductance) in *giant vesicles*, die trans-cis-isomerisierbare lipidähnliche Moleküle enthielten. Zwischen den beiden Konformationen konnte durch Lichteinstrahlung bei $\lambda = 365$ nm bzw. bei

$\lambda > 400$ nm umgeschaltet werden, was zu einem reversiblen Anstieg oder Abfall der Kanalaktivität führte. Bennett et al.^[48] verwendeten ebenfalls Vesikel, um ein lichtgetriebenes Ca^{2+} -Transport-System zu entwickeln. Es besteht aus einem artifiziellen photosynthetischen Reaktionszentrum innerhalb der Membran und einem redoxsensitiven, lipophilen Ca^{2+} -Shuttle-Molekül. Die reduzierte Form des Shuttle-Moleküls bindet Ca^{2+} an der einen Seite und transportiert es zur gegenüberliegenden Seite der Membran. Durch photoinduzierten Elektronentransfer wird es dort durch das Reaktionszentrum oxidiert und gibt das Ca^{2+} -Ion frei. Nach der Rückdiffusion wird es erneut durch photoinduzierten Elektronentransfer reduziert und kann wieder Ca^{2+} binden. Auf diese Weise konnten die Autoren den Aufbau eines signifikanten elektrochemischen Potentials beobachten. Die beiden zuletzt angeführten Anwendungen sollten auch bei Verwendung planarer Lipiddoppelschichten realisierbar sein.

Als letztes Beispiel für Modellmembranen zum Studium lichtaktivierter Prozesse sei ein Experiment von Benkoski et al.^[49] genannt. Sie integrierten ein hydrophobes Polymer, das photosensitive Seitenketten trägt, in eine festkörperunterstützte Lipiddoppelschicht. Die Seitenketten können bei Bestrahlung mit UV-Licht ein Proton aufnehmen oder abgeben und verwandeln die hydrophoben Polymere so in Polyelektrolyte. Diese desorbierten aufgrund der stark erhöhten Hydrophilie spontan von der Oberfläche, was über Quarzmikrowaagemessungen verfolgt werden konnte. Die Autoren schlugen die Kopplung von Biomolekülen an diese Art Polymere vor, um Biosensoren mit reversiblen Adsorptionseigenschaften zu entwickeln.

1.3 Bacteriorhodopsin

Bacteriorhodopsin (bR) ist eines der am besten charakterisierten Membranproteine. Dies ist zum einen seiner einzigartigen Stabilität gegenüber äußeren Einflüssen wie hohen Salzkonzentrationen, hohen Temperaturen, photochemischer Degeneration und extremen pH-Werten zu verdanken^[50], zum anderen der Tatsache,

daß es als einfaches Modell für eine Klasse von Membranrezeptoren, den G-Protein-gekoppelten 7-Helix-Rezeptoren, von denen die meisten potentielle Angriffspunkte für neue Medikamente sind, dient. Es wurde 1971 von Oesterhelt und Stoeckenius^[51] in der Purpurmembran von *Halobacterium salinarium* entdeckt. Diese Membran besteht zu 25 % aus Lipiden und zu 75 % aus Bacteriorhodopsin, das dort eine hoch geordnete Struktur aus Trimeren ausbildet. Bei Sauerstoffmangel wirkt es als lichtgetriebene Protonenpumpe und baut einen Protonengradienten über die Membran auf. Dieser wird zur ATP-Produktion durch die ATP-Synthase genutzt. Bereits 1975 rekonstruierten Henderson & Unwin^[53] das

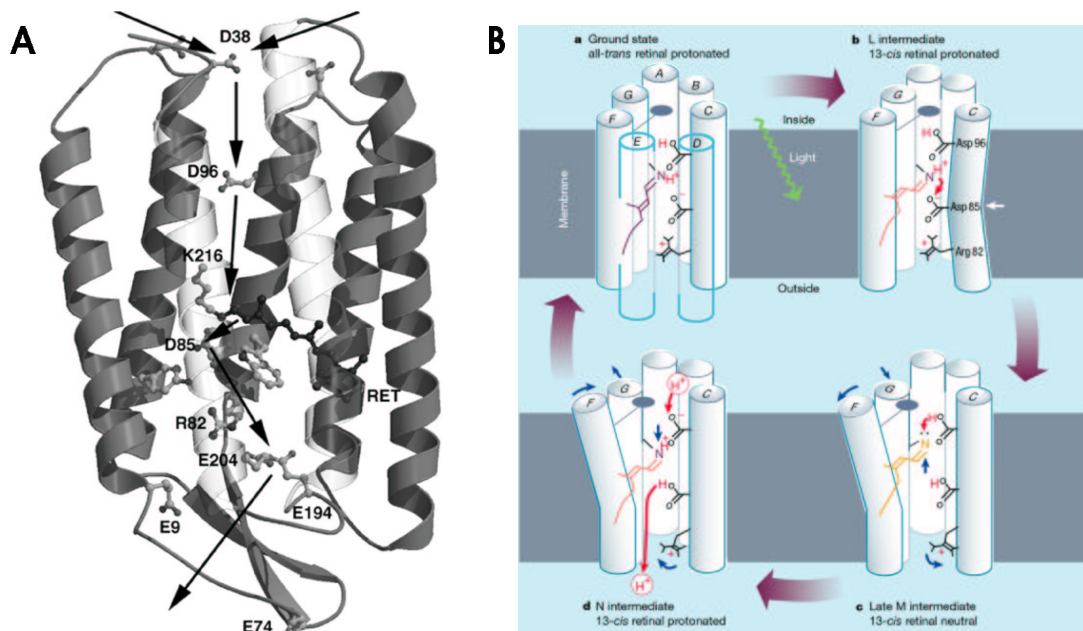


Abb. 1.1: **A** Seitenansicht eines Bacteriorhodopsin-Moleküls: wichtige Aminosäurereste sind in *ball and stick*-Darstellung gezeigt. Der mögliche Weg der Protonen durch das Protein ist durch Pfeile angedeutet. **B** Der molekulare Mechanismus des Protonenpumpens im Bacteriorhodopsin^[52].

dreidimensionale Bild der Purpurmembran, in dem Bacteriorhodopsin bereits als Struktur mit 7 Helices zu erkennen war. Das 26,7 kDa große Protein besteht aus insgesamt 248 Aminosäuren. Die hydrophoben, dichtgepackten Helices, verbunden durch kurze Extramembranschleifen, durchspannen die Membran in einem Winkel fast senkrecht zur Membranachse. Ein Retinalmolekül, als Schiffsbasis an Lysin²¹⁶ gebunden, liegt etwa 20° geneigt zur Membranebene im inneren

Bereich der sieben Helices^[54]. Die Belichtung von BR initiiert einen Reaktionszyklus, der mit der Isomerisierung dieses protonierten 13-*trans* Retinals (B₅₆₈) zum protonierten 13-*cis* Retinal (K₅₉₀) beginnt. Diese Isomerisierung führt zu einer pKs-Verschiebung der Schiffischen Base von 10 auf 6, so daß das Proton auf Aspartat⁸⁵ übertragen wird (M₄₁₀). Im M-Zustand liegt das Retinal-Molekül durch die Deprotonierung gestreckt vor. Dies initiiert eine Konformationsänderung im Protein, die als zentrales Ereignis in allen Ionenpumpen postuliert wird: der Transfer der Zugänglichkeit des aktiven Zentrums von einer Seite zur anderen. Durch die Streckung *drückt* das Retinal gegen Helix F und zwingt diese dazu, sich ein wenig nach außen zu biegen. Dadurch wird auf der cytosolischen Seite der Membran ein Kanal geöffnet, durch den ein Proton aus dem Cytosol Asparaginsäure reprotonieren kann. Diese wiederum hatte vorher ihr Proton im M-N-Übergang auf Retinal übertragen. Um den Zyklus zu vollenden und netto ein Proton aus dem Cytosol über die Membran zu transportieren, entläßt Aspartat⁸⁵ sein Proton über ein Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen und Wassermolekülen ins umgebende Medium^[40, 52].

Es wurden immer wieder auch technische Anwendungsmöglichkeiten von Bacteriorhodopsin diskutiert. Offensichtlich ist, das Protein zur Umwandlung von Licht in elektrochemische Energie zu nutzen. Eine bR-Solarzelle wurde von Caplan und Fischer^[7] vorgestellt. Sie zeigte jedoch nur eine Umwandlungseffizienz von 0,5 %. Eine weitere Anwendung nutzt die photochromatischen Eigenschaften von Bacteriorhodopsin. Die verschiedenen Intermediate des Photozyklus haben alle unterschiedliche Absorptionsmaxima und Lebensdauern. Technisch interessant sind vor allem das M- und Q-Intermediat, da sie sowohl die größte Verschiebung des Absorptionsmaximums zeigen als auch die langlebigsten Zustände sind. Durch gezielte Anregung mit geeigneten Wellenlängen kann man zwischen diesen Intermediaten und dem Grundzustand von bR umschalten. Auf dieser Grundlage wurde versucht, optische und holographische Speicher zu entwickeln^[55, 56].

1.4 *Chlamydomonas reinhardtii*

Chlamydomonas reinhardtii ist eine einzellige Grünalge aus der Familie der *Chlorophyceae*. Abb. 1.2 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme sowie eine schematische Darstellung der 8-10 μm großen Zelle. Den größten Platz nimmt der grün dargestellte Chloroplast ein. Außerdem sind der Zellkern, ein Mitochondrium und die Vakuole eingezeichnet. Besonders auffällig ist der rötliche Augenfleck, der sich

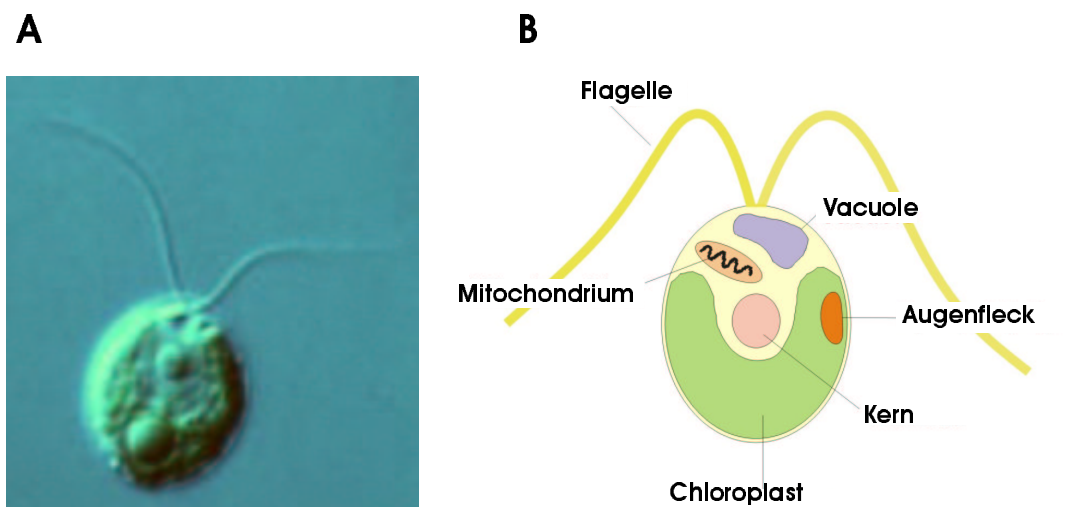


Abb. 1.2: **A** Eine *Chlamydomonas reinhardtii*-Zelle unter dem Lichtmikroskop. **B** Schematische Darstellung der Zelle: Im Augenfleck (rötlich dargestellt) ist der Photorezeptor lokalisiert (nach Hegemann^[57]).

im linken Arm des Chloroplasts direkt an der Zellmembran befindet. Durch die Schlagbewegung zweier Flagellen können sich die Zellen mit einer Geschwindigkeit von ca. 120 $\mu\text{m/s}$ „brustschwimmend“, d. h. mit den Flagellen voran, fortbewegen. Da letztere nicht genau in einer Ebene schlagen, resultiert eine der Vorwärtsbewegung überlagerte Rotation um die eigene Längsachse mit einer Frequenz von ca. 2 Hz. Das Schwimmverhalten der Algen wird durch die Lichtverhältnisse beeinflusst, wobei man zwei verschiedene Reaktionsmuster unterscheiden kann:

- Photophobische Reaktion: Bei plötzlicher starker Änderung der Lichtintensität stoppen die Zellen ihre Schwimmbewegung, schwimmen kurz rückwärts und schließlich in eine andere Richtung vorwärts weiter. Dieses Verhalten verhindert, daß die Alge häufig von Orten intensiver Sonneneinstrahlung zu schattigen Stellen schwimmt, so daß unnötiges Umadaptieren des photosynthetischen Apparates entfällt.
- Positive/negative Phototaxis: Bei Dauerbeleuchtung versucht die Zelle möglichst günstige Lichtbedingungen aufzusuchen, indem sie solange die Richtung wechselt, bis sie bei hoher Lichtintensität von der Lichtquelle wegschwimmt oder sich bei geringer Intensität darauf zu bewegt. Dies wird dadurch erreicht, daß nur eine Flagelle ihr Schlagmuster kurzzeitig ändert.

Das Photorezeptorsystem, das für die Umwandlung der Lichtsignale in Flagellenbewegungen verantwortlich ist, ist im Augenfleck lokalisiert. Abb. 1.3 zeigt eine schematische Darstellung der Augenfleckregion. Die rötliche Farbe des „Auges“ ist auf carotinoidhaltige Vesikel zurückzuführen. Sie sind in Schichten von 125 nm Dicke und Abstand angeordnet, was jeweils $\lambda/4$ des Absorptionsmaximums des Photorezeptors entspricht. Dank dieses Aufbaus wirkt der Augenfleck als Interferenzreflektor. Licht, das von der dem optischen System zugewandten Seite einstrahlt, wird an den Vesikel-Schichten reflektiert und durch positive Interferenz verstärkt, während Licht, das durch den Zellkörper einfällt, abgeschirmt wird. Aufgrund der Rotation der Zelle wird der Photorezeptor, der sich in der Plasmamembran an der Außenseite des Augenflecks befindet, mit einer Frequenz von 2 Hz aktiviert.

Foster et al.^[58] konnten durch Experimente mit Retinal-defizienten Zellen erstmals zeigen, daß es sich bei dem Photorezeptor um ein Rhodopsin handelt. Durch Expression zweier Rhodopsine aus dem Augenfleck in Oozyten zeigten Nagel et al.^[59,60], daß es sich dabei um direkt lichtaktivierte Ionenkanäle handelt. Sie wurden daher Channelrhodopsin I und II genannt. Erstgenannter Ionenkanal weist eine Selektivität für Protonen auf, letzterer hauptsächlich für Ca^{2+} -Ionen, aber auch für Protonen und Na^+ -Ionen. Wie in Abb. 1.3 angedeutet ist, werden durch

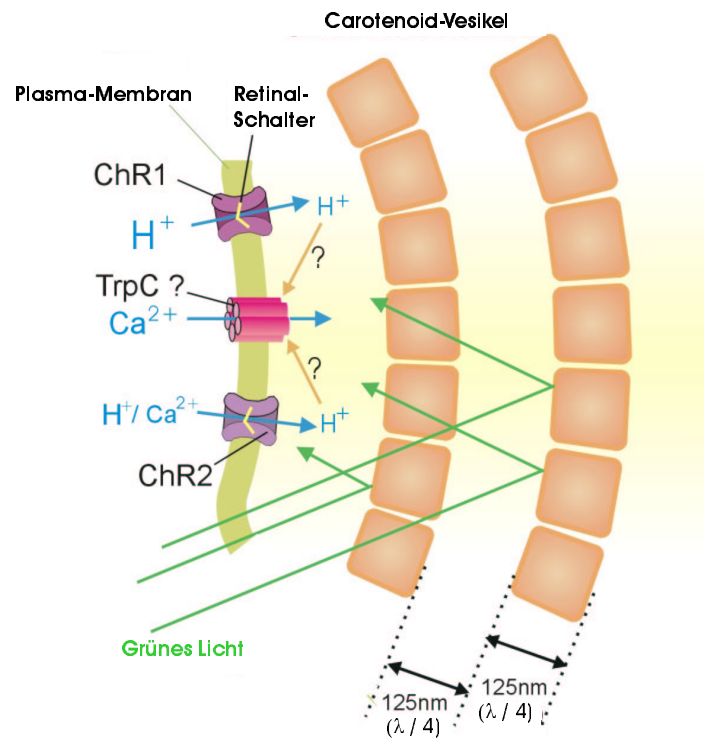


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Augenfleckregion. Eine Schichtanordnung aus carotinoidhaltigen Vesikeln wirkt als Interferenzreflektor und ermöglicht die Detektion der Richtung des einfallenden Lichts. Die Photorezeptoren Channelrhodopsin I und II sind an der Außenseite des Augenflecks lokalisiert und stellen lichtaktivierte Kationenkanäle dar (nach Hegemann^[57]).

den primären Kationeneinstrom vermutlich weitere spannungsgesteuerte Kationenkanäle geöffnet, die das elektrische Signal entlang der Plasmamembran weiter bis in die Flagellen leiten und dort letztlich ein verändertes Schlagmuster der Flagellen verursachen.

2 Zielsetzung

Porenüberspannende Lipiddoppelschichten auf der Basis poröser Aluminate bilden ein neuartiges Modellsystem für biologische Membranen, das die Vorteile von Membranen auf planaren Festkörpern und freitragenden Membranen in sich vereinen soll. Dabei stellen die Poren des Substrats ein zweites wäßriges Kompartiment dar, das den Einbau großer Membranproteine und die Messung stationärer Ströme im Fall von elektrogenen Proteinen erlauben soll, während die Porenstege die Langzeitstabilität gewährleisten sollen.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Eignung dieses Membransystems zum Studium lichtaktivierter Proteine und Reaktionen anhand von Bacteriorhodopsin als Modellprotein untersucht werden. Letzteres ist gut charakterisiert und äußerst robust. Darüber hinaus ist der Nachweis der Aktivität des Proteins einfach durch Messung des lichtgetriebenen Protonenstroms möglich. Unter die genannte Kategorie fallen nicht nur direkt lichtaktivierte Proteine, sondern auch solche, die indirekt durch Licht aktiviert werden können. Als Beispiel seien durch *caged*-ATP aktivierte ATPasen genannt.

Aus dem Auftreten transienter Ströme bei der Charakterisierung elektrogener Membranproteine kann geschlossen werden, daß Ladungstranslokation stattfindet. Dies kann z.B. auch auf Ladungsverschiebungen innerhalb des Proteins zurückgeführt werden. Erst das Auftreten stationärer Ströme zeigt, daß Ionen-transfer über die Membran erfolgt. Ein wichtiger Aspekt bei der Untersuchung der Aktivität von Bacteriorhodopsin in dem neuen Modellsystem war daher, den Protonentransfer in die Poren durch Messung stationärer Ströme zu beobachten.

3 Methoden

3.1 Impedanzspektroskopie

Die Impedanzspektroskopie (IS) ist eine elektrochemische Meßmethode, mit der intrinsische elektrische Eigenschaften von Festkörpern, Flüssigkeiten und deren Grenzflächen charakterisiert werden können. Bestimmt man in einem Wechselstromkreis das Verhältnis von angelegter Spannung und resultierendem Strom (die Impedanz) und variiert dabei kontinuierlich die Frequenz der Spannung, so erhält man ein Impedanzspektrum. Es liefert einerseits Aussagen über Leitfähigkeiten und Dielektrizitätskonstanten, andererseits kann man auch Informationen über den Bedeckungsgrad von Metallen mit organischen Schichten erhalten. Der Vorteil der Impedanzspektroskopie gegenüber anderen elektrochemischen Methoden, wie der Cyclovoltammetrie oder der Chronoamperometrie, liegt in der Verwendung einer niedrigen Amplitude des Erregersignals, was eine zerstörungsfreie Messung erlaubt.

3.1.1 Physikalische Grundlagen

Als Impedanz, eine komplexe Größe, wird der frequenzabhängige Widerstand Z eines Wechselstromkreises bezeichnet. Im Gegensatz zu kapazitiven oder induktiven Elementen ist die Impedanz eines ohmschen Widerstandes frequenzunabhängig. Erstgenannte bewirken als Blindwiderstände Phasenverschiebungen zwischen aufgeprägter Spannung und resultierendem Strom. Auf der Grundlage des Ohmschen Gesetzes erhält man für die Impedanz Z in Polarkoordinaten¹:

¹U: Spannung, I: Strom, t: Zeit, ω : Kreisfrequenz, ϕ : Phase

$$Z(\omega) = \frac{U(\omega, t)}{I(\omega, t)} = \frac{U_0 \exp(i\omega t)}{I_0(\omega) \exp(i(\omega t - \phi(\omega)))} = |Z| \exp(i\phi) \quad (3.1)$$

Bei Schreibweise in kartesischen Koordinaten erhält man²:

$$Z(\omega) = Z^{Re}(\omega) + iZ^{Im}(\omega) \quad (3.2)$$

Dies entspricht einem Vektor in der Gaußschen Zahlenebene mit dem Betrag $|Z|$ und dem Winkel ϕ zur realen Achse (Abb. 3.1).

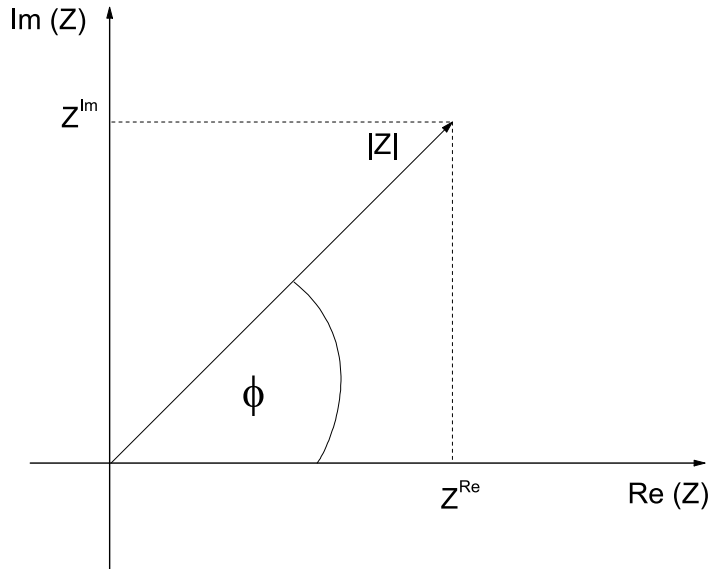


Abb. 3.1: Zeigerdiagramm (Ortskurve) zur Darstellung der Impedanz in der Gaußschen Zahlenebene.

Aus dem Zeigerdiagramm, auch Ortskurve genannt, ergeben sich für die Impedanz $|Z|$ bzw. die Phasenverschiebung ϕ folgende Gleichungen (3.3, 3.4):

$$|Z| = \sqrt{(Z^{Re})^2 + (Z^{Im})^2} \quad (3.3)$$

$$\phi = \arctan\left(\frac{Z^{Im}}{Z^{Re}}\right) \quad (3.4)$$

² Z^{Re} : Realteil der Impedanz (Wirkwiderstand), Z^{Im} : Imaginärteil der Impedanz (Blindwiderstand)

3.1.2 Auswertung der Spektren

Zur Auswertung eines Impedanzspektrums muß zunächst aus einem physikalischen Modell für die untersuchte Probe ein geeignetes Ersatzschaltbild aufgestellt werden, das die gleiche Impedanz-Frequenz-Charakteristik wie die Probe besitzt. Mit Hilfe der Kirchhoff'schen Regeln kann nun eine Übertragungsfunktion erstellt werden. Die Parameter dieser Funktion werden durch nichtlineare Kurvenanpassung (*non-linear-least-square-fit*), z. B. mit dem Levenberg-Marquardt-Algorithmus, ermittelt. In Abb. 3.2 ist die Vorgehensweise noch einmal graphisch dargestellt. Eigenschaften von Impedanzelementen, die häufig zur Modellierung

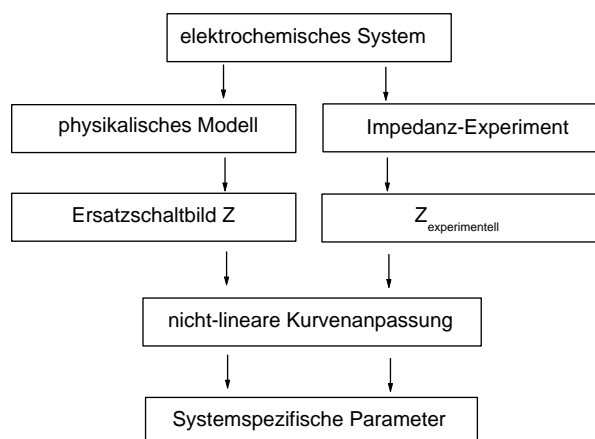


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der Auswertung von Impedanzspektren (nach Ende & Mangold 1993)^[61].

elektrochemischer Systeme eingesetzt werden, sind in Tabelle 3.1 zusammengefaßt. Neben den aus der Elektrotechnik bekannten Bauelementen wie Ohmscher Widerstand, Kondensator und Spule sind auch zwei Elemente aufgeführt, die das nichtideale Verhalten elektrochemischer Systeme berücksichtigen. Die Warburg-Impedanz repräsentiert Widerstandsbeiträge, die durch den diffusionsabhängigen Massentransport von Ionen entstehen, während das Konstante Phasenelement zur Beschreibung von Materialien mit heterogener Grenzflächentopographie herangezogen wird. Für den Grenzfall $n = 1$ verhält sich das Konstante Phasenelement wie ein idealer Kondensator.

Tabelle 3.1: Impedanzelemente

Impedanzelement	Widerstand Z	Phasenverschiebung ϕ
Ohmscher Widerstand R	R	0
Kapazität C	$\frac{1}{i\omega C}$	$-\frac{\pi}{2}$
Induktivität L	$i\omega L$	$+\frac{\pi}{2}$
Konst. Phasenelement CPE	$\frac{1}{A(i\omega)^n}$	$-n\frac{\pi}{2}$
Warburg Impedanz σ	$\frac{\sigma(1-i)}{\omega^{0,5}}$	frequenzabhängig

3.1.3 Elektrische Beschreibung festkörperunterstützter Membranen

Die elektrischen Eigenschaften einer Lipiddoppelschicht können durch eine Parallelschaltung aus einer Membrankapazität C_m und einem Membranwiderstand R_m beschrieben werden. Zur Beschreibung des Gesamtsystems müssen weitere idea-

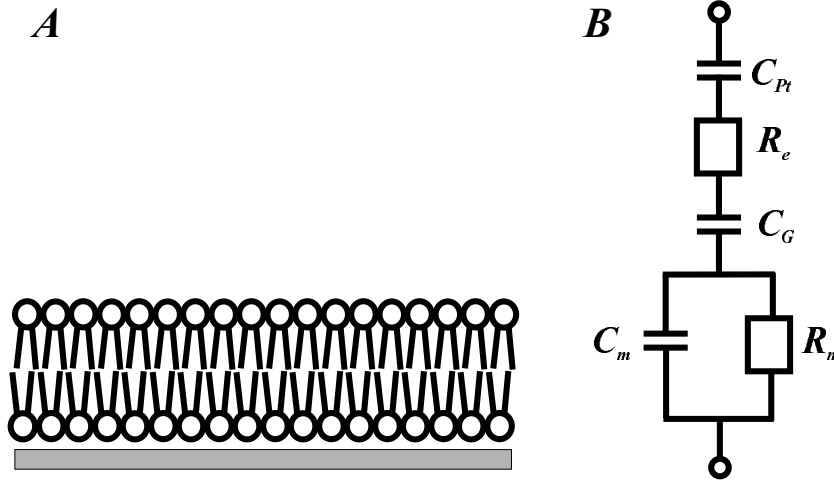


Abb. 3.3: **A:** Schematische Darstellung einer festkörperunterstützten Lipiddoppelschicht. **B:** Ersatzschaltbild zur Beschreibung dieses Systems, bestehend aus den Doppelschichtkapazitäten C_{Pt} an der Platinelektrode und C_G an der Grenzfläche Membran/Elektrolyt, dem Elektrolytwiderstand R_e , sowie der Parallelschaltung aus Membrankapazität C_m und Membranwiderstand R_m .

le Bauelemente herangezogen werden. Neben dem Elektrolytwiderstand R_e sind dies auch die Kapazitäten, die sich aus den elektrochemischen Doppelschichten an den einzelnen Grenzflächen ergeben. Im Einzelnen sind dies die Doppelschichtka-

pazitäten an der Grenzfläche Membran/Elektrolyt (C_G), sowie an der Platinelektrode (C_{Pt}). Das resultierende Ersatzschaltbild ist in Abb. 3.3 gezeigt. Die genannten Doppelschichtkapazitäten können im Impedanzspektrum nicht voneinander unterschieden werden und werden daher zur Kapazität (C_{el}) zusammengefaßt. Es ergibt sich das in Abb. 3.4 A gezeigte Ersatzschaltbild. Eine weitere Vereinfachung ergibt sich für den Fall sehr hoher Membranwiderstände. Kann der Widerstand im gewählten Frequenzfenster nicht bestimmt werden, so vereinfacht sich das Ersatzschaltbild zur einer in Abb. 3.4 B gezeigten seriellen Anordnung von Widerstand und Kapazität. Dabei werden C_m und C_{el} zu C_{el+m} zusammengefaßt.

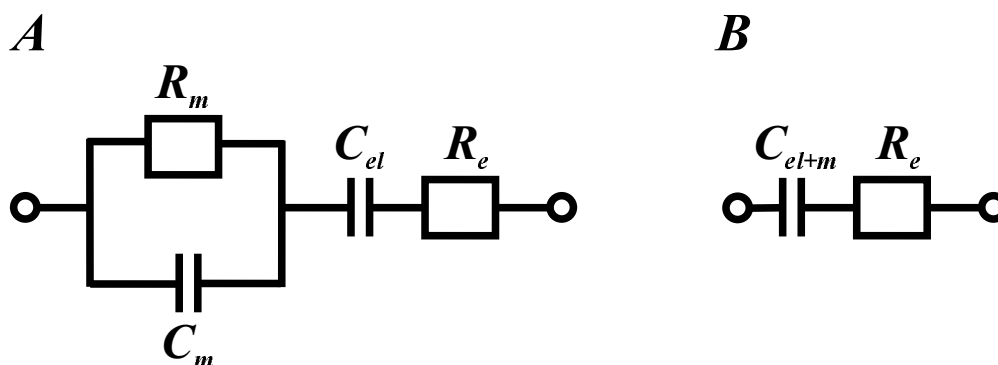


Abb. 3.4: **A:** Ersatzschaltbild zur Beschreibung einer festkörperunterstützten Lipiddoppelschicht nach Zusammenfassung von C_{Pt} und C_G zu C_{el} . **B:** vereinfachtes Ersatzschaltbild für den Fall sehr hoher Membranwiderstände.

3.1.4 Elektrische Beschreibung porenüberspannender Membranen

Das Ersatzschaltbild zur Beschreibung der elektrischen Eigenschaften einer porenüberspannenden Lipidmembran ist in Abb. 3.5 zusammen mit einer schematischen Darstellung des Systems gezeigt. Wie im vorigen Abschnitt erläutert, wird die Lipidmembran wieder durch eine Parallelschaltung aus Membranwiderstand R_m und Membrankapazität C_m beschrieben. Ebenso wird die Elektrolytlösung wieder durch einen Ohmschen Widerstand R_e repräsentiert. Die Doppelschichtkapazitäten an den beiden Platinelektroden (nicht gezeigt) werden analog zum

vorangegangenen Kapitel zu C_{el} zusammengefaßt. Das poröse Aluminat selber findet keine Berücksichtigung im Ersatzschaltbild, da der elektrische Strom ausschließlich durch die mit Elektrolyt gefüllten Poren fließt.

Für den Fall sehr hoher Membranwiderstände läßt sich auch dieses Netzwerk weiter vereinfachen. Kann R_m im beobachteten Frequenzfenster nicht detektiert werden, so werden C_m und C_{el} wieder zu C_{el+m} zusammengefaßt. Es ergibt sich das in Abb. 3.5 C gezeigte Ersatzschaltbild.

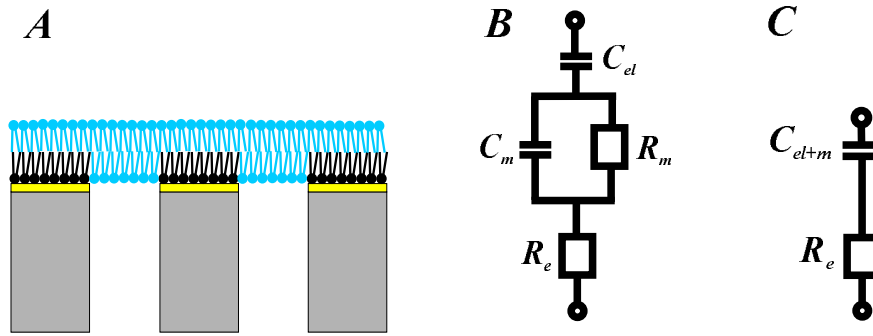


Abb. 3.5: **A:** Schematische Darstellung einer porenüberspannenden Membran. **B:** Ersatzschaltbild zur Beschreibung porenüberspannender Membranen, bestehend aus der Kapazität C_{el} , die die elektrochemischen Doppelschichten an den Elektroden berücksichtigt, dem Elektrolytwiderstand R_e und der Parallelschaltung aus Membrankapazität C_m und Membranwiderstand R_m . **C:** vereinfachtes Ersatzschaltbild für den Fall sehr hoher Membranwiderstände.

3.1.5 Darstellung von Impedanzspektren

Die Impedanz wird entweder durch die Angabe ihres Betrages $|Z|$ und der Phasenverschiebung ϕ oder durch den Real- (Z') und den Imaginärteil (Z'') vollständig beschrieben. Da eine Auftragung der jeweiligen Meßgrößenpaare gegen die Frequenz des Erregersignals zwangsläufig eine dreidimensionale Grafik ergibt, die allenfalls für sehr einfache Systeme geeignet ist, haben sich in der Literatur zwei zweidimensionale Darstellungsmöglichkeiten etabliert. Die Auftragung von Real- und Imaginärteil in einem Diagramm wird Ortskurve genannt und wurde bereits in Kapitel 3.1.1 vorgestellt. Im sogenannten Bode-Diagramm werden der Betrag der Impedanz $|Z|$ und die Phasenverschiebung ϕ separat gegen die Frequenz des Erregersignals f aufgetragen.

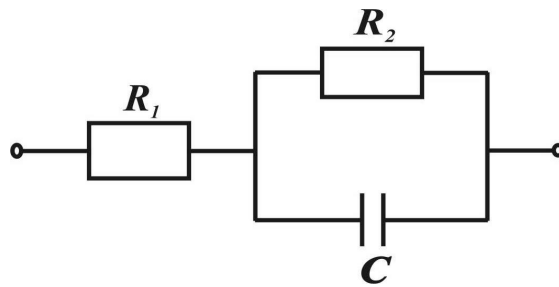


Abb. 3.6: Netzwerk zur Erklärung des Bode-Diagramms, bestehend aus zwei Ohmschen Widerständen $R_1(100\ \Omega)$ und $R_2(10^6\ \Omega)$ und einer Kapazität C

In dieser Arbeit fand ausschließlich die Auftragung in einem Bode-Diagramm Anwendung. Es soll daher im folgenden anhand des einfachen Netzwerks in Abb. 3.6 näher erläutert werden. Die entsprechenden Werte des Betrages der Impedanz und des Phasenwinkels sind in Abb. 3.7 aufgetragen. In den Bereichen sehr hoher (3) bzw. sehr niedriger Frequenzen zeigt das Netzwerk ein für Ohmsche Widerstände typisches Impedanzverhalten. Der Betrag der Impedanz ist frequenzunabhängig, Strom und Spannung sind in Phase. Im Bereich 3 entspricht der Betrag der Impedanz dem Wert des Widerstandes R_1 , im Bereich 1 der Summe aus $R_1 + R_2$. Im Bereich 2 zeigt sich der Einfluß der Kapazität auf das Impedanzverhalten des Netzwerks. Strom und Spannung sind um -90° phasenverschoben, der Betrag der Impedanz verhält sich umgekehrt proportional zur Frequenz. Der Wert der Kapazität kann in diesem Bereich über die Beziehung $\log|Z| = -\log(2\pi fC)$ ermittelt werden.

3.1.6 Experimenteller Teil

3.1.6.1 Meßmethode

In dieser Arbeit kam ausschließlich die *continuous wave* IS zum Einsatz. Bei dieser Methode wird dem System eine sinusförmige Wechselspannung geringer Amplitude aufgeprägt, wobei die Frequenz diskret variiert wird. Der Impedanzanalysator, in diesem Fall das Gerät SI 1260 der Firma Solartron (abgedeckter Frequenzbereich: $1\ \mu\text{Hz}$ -32 MHz), mißt den resultierenden Strom und übermittelt den Betrag der Impedanz und die Phasenverschiebung als Meßdaten zu einem Com-

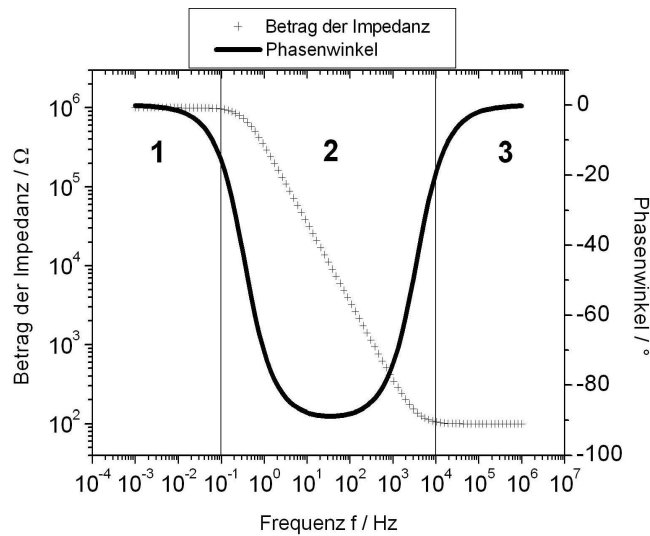


Abb. 3.7: Bode-Diagramm des Netzwerks aus Abb. 3.6: halb- bzw. doppeltlogarithmische Auftragung des Phasenwinkels ϕ bzw. des Betrags der Impedanz $|Z|$ gegen die Erregerfrequenz f .

puter. Die Amplitude des Erregersignals betrug bei allen Messungen 30 mV, ein Gleichspannungsanteil wurde nicht überlagert. Für Messungen hoher Widerstände bei kleinen Frequenzen wurde das Dielectric Interface 1296 der Firma Solartron zugeschaltet. In diesem Fall waren Messungen in einem Frequenzbereich von $10^{-3} - 10^6$ Hz möglich.

3.1.6.2 Meßaufbau für Goldelektroden und geschlossene Poren

Zur Vermessung von Thiolmono- und Lipiddoppelschichten, die auf Goldelektroden oder porösen Aluminaten mit geschlossenen Poren präpariert wurden, diente der in Abb. 3.8 dargestellte Meßaufbau. Eine auf einem Deckglas aufgedampfte, kreisförmige Goldelektrode diente als Arbeitselektrode, ein platinierter Platindraht als Gegenelektrode. Als Meßlösung diente jeweils der später auch für die Photostrommessungen verwendete Puffer.

3.1.6.3 Meßaufbau für geöffnete Poren

Der zur Vermessung von Lipidschichten auf porösem Aluminat verwendete Meßaufbau ist in Abb. 3.13 dargestellt und wird in Kap. 3.3.1.1 näher beschrieben. Sowohl als Arbeits- als auch als Gegenelektrode diente hier eine platinierete Platinelektrode.

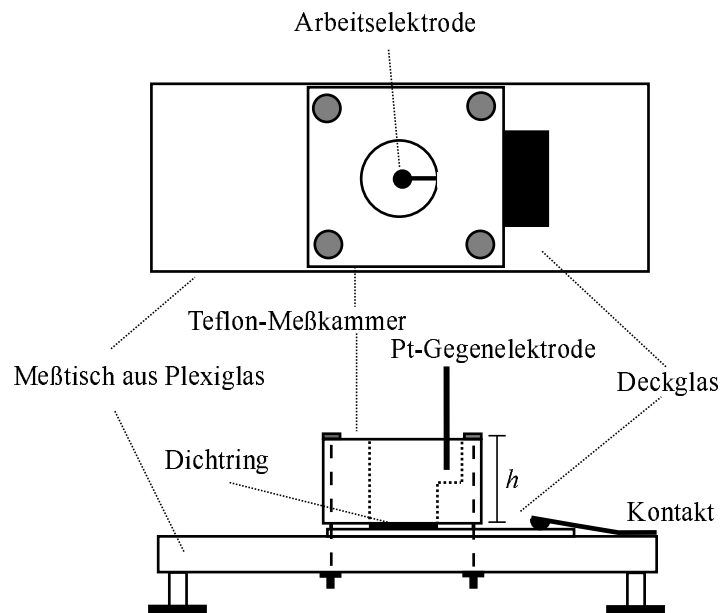


Abb. 3.8: Schematischer Aufbau der Meßkammer zur Aufnahme der Impedanzspektren von beschichteten Goldsubstraten. Abmessungen des Meßaufbaus: Meßtisch aus Plexiglas: (120 x 55) mm; Teflon-Meßkammer: (37 x 18) mm, h : 10 mm; \varnothing_i des Hohlraums: 7 mm; \varnothing_a der Fräsung für den Dichtring: 10 mm; Dichtring: \varnothing_i 7 mm; Fläche der Goldelektrode: $0,045 \text{ cm}^2$.

3.2 Dissipative Quarzmikrowaagetechnik

Die Quarzmikrowaagetechnik (QCM) ist eine oberflächenanalytische Methode, die in den letzten Jahren eine immer größere Bedeutung erlangt hat. Sie erlaubt die *in situ* Detektion von Oberflächenprozessen, die mit einer bis in den Bereich weniger Nanogramm reichenden Massenabscheidung an die Oberfläche eines scheibenförmigen Schwingquarzes verbunden sind. Dabei wird die mit der Massenabscheidung einhergehende Resonanzfrequenzänderung der Scherschwingung analytisch genutzt. Das Prinzip der QCM ist schon seit den 50er Jahren bekannt und wurde zur Massen- und Dickenbestimmung von dünnen Schichten an Luft oder im Vakuum, z. B. in der Elektrochemie, eingesetzt. Erst seit den 80er Jahren war es möglich diese Technik auch in Flüssigkeiten zu betreiben. Sie wurde dadurch auch für die Biowissenschaften interessant, da nun Bindungsphänomene von Proteinen und Nukleinsäuren, sowie immunologische Erkennungsreaktionen untersucht werden konnten^[8, 62–68].

3.2.1 Piezoelektrizität und akustische Sensoren

Als piezoelektrischen Effekt bezeichnet man das Auftreten einer elektrischen Potentialdifferenz zwischen den Oberflächen eines Kristalls als Folge einer mechanischen Deformation. Voraussetzung für das Auftreten von Piezoelektrizität ist das Fehlen eines Punktsymmetriezentrums im Kristallgitter, wie z. B. im Quarz. Dieser Effekt lässt sich umkehren. Legt man an die Grenzflächen eines piezoelektrischen Kristalls eine elektrische Spannung an, so wird eine mechanische Deformation induziert. Dieser inverse piezoelektrische Effekt ist die Basis der Quarzmikrowaage-technik, da nach Anregung durch eine elektrische Spannung eine mechanische Schwingung des Quarzes um seine Ausgangslage einsetzt. Wie bereits erwähnt, kann dann die Änderung der Resonanzfrequenz aufgrund von Oberflächenprozessen analytisch genutzt werden.

Abhängig vom Winkel mit dem ein Quarzplättchen aus dem nativen α -Quarz herausgeschnitten wird, lassen sich mehrere Varianten akustischer Sensoren unterscheiden, je nachdem, welche Schwingung auftritt. Man differenziert zwischen Oberflächenwellen, wie sie in den *surface acoustic wave-* (SAW), *acoustic plate mode-* (APM) und *flexural plate mode-* (FPM) Sensoren auftreten und den Wellen, die sich im Körper des Quarzes fortpflanzen, wie die *thickness shear mode-* (TSM) Resonatoren. In der QCM werden vor allem AT-cut-Quarze verwendet, die in einem Winkel von $35^\circ 10'$ zur kristallographischen z-Achse aus dem Quarzkristall geschnitten wurden^[8]. Sie gehören zu den TSM-Resonatoren und können zu einer Dickenscherschwingung angeregt werden, wie Abb. 3.9 zeigt. Darüber hinaus weisen AT-cut-Quarze eine geringe Temperaturabhängigkeit der Resonanzschwingung auf.

3.2.2 Physikalische Grundlagen

Durch Anlegen einer elektrischen Spannung über auf beiden Seiten aufgebrachte Metallelektroden können AT-Quarzscheiben zur resonanten Dickenscherschwingung angeregt werden. Diese tritt als stehende Welle, die aus der Überlagerung einer halben Welle mit ihrer Reflexion entsteht, zwischen den beiden Oberflächen im Bereich der sich überlappenden Elektroden des Quarzes auf^[69]. Sie besitzt an

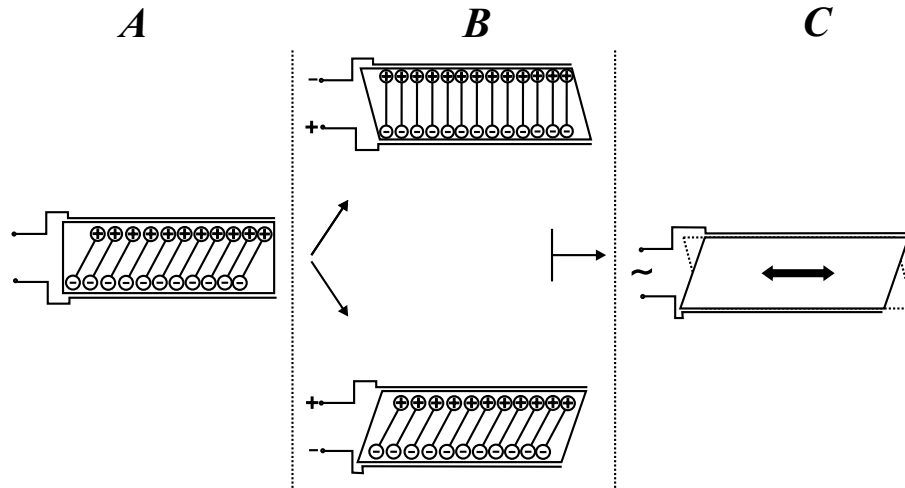


Abb. 3.9: Schematisierte Darstellung des inversen Piezo-Effektes anhand der Scherdeformation einer Quarzscheibe im AT-Schnitt. Durch Anlegen einer elektrischen Wechselspannung wird eine Scherschwingung des Kristalls induziert.

den Grenzflächen ($z = \pm d_q/2$) einen Schwingungsbauch und bei $z = 0$ einen Knotenpunkt. Die Resonanzfrequenz hängt folglich von der Dicke d_q der Quarzscheibe ab:

$$f_0 = \frac{1}{2d_q} \sqrt{\frac{\mu_q}{\rho_q}}, \quad (3.5)$$

wobei μ_q das Schermodul und ρ_q die Dichte des Quarzes ist. Bei einer homogenen Bedeckung der Quarzoberfläche mit einer Fremdmasse entspricht dies einer Dickenzunahme des Quarzes. Laut Gleichung 3.5 ist eine solche Dickenzunahme mit einer Erniedrigung der Resonanzfrequenz verbunden. Für den Fall, daß das abgeschiedene Material näherungsweise die gleiche Dichte wie Quarz besitzt, leitete 1959 Sauerbrey zum ersten Mal einen linearen Zusammenhang zwischen der Frequenzänderung Δf und der Massenänderung Δm ab:

$$\Delta f = -f_0 \frac{\Delta d}{d_q} = -\frac{2f_0^2 \Delta m}{A \sqrt{\mu_q \rho_q}} = -C_f \Delta m \quad (3.6)$$

Die Proportionalitätskonstante C_f wird als integrale Schichtwäageempfindlichkeit oder Sauerbrey-Konstante bezeichnet. Laut Gleichung 3.6 hängt sie quadratisch von der Resonanzfrequenz ab. Die Empfindlichkeit der Messung kann also durch Verwendung von Quarzen mit höherer Resonanzfrequenz gesteigert werden. Da diese jedoch auch entsprechend dünner sind, ist aus praktischen Gründen eine natürliche Limitierung gegeben. Die in dieser Arbeit verwendeten Quarzresonatoren

mit einer Resonanzfrequenz von 5 MHz besitzen eine Dicke von $d_q = 330 \mu\text{m}$. Eine orts aufgelöste Betrachtung der Schichtwägemempfindlichkeit eines Quarzes zeigt, daß diese in der Mitte des Quarzes am größten ist und zu den Elektrodenrändern hin absinkt.

Die von Sauerbrey hergeleitete Beziehung zwischen Frequenz- und Massenänderung gilt streng genommen nur für Messungen in der Gasphase. Durch die Beschichtung einer Quarzseite mit einer idealen Newtonschen Flüssigkeit kommt es zu einer Fortsetzung der Scherwelle in die Flüssigkeit hinein. Sie wird dort in Abhängigkeit von der Dichte ρ_l und der Viskosität η_l der Flüssigkeit unterschiedlich stark gedämpft. Es ergibt sich als einhüllende Funktion der gedämpften Welle eine exponentielle Abklingkurve, aus der die Eindringtiefe der Welle in die Flüssigkeit bestimmt werden kann^[70]. Einen theoretischen Zusammenhang zwischen der Resonanzfrequenzänderung des Quarzes und den Eigenschaften der überschichteten Flüssigkeit beschrieben 1985 Kanazawa und Gordon^[71]:

$$\Delta f = -f_0^{\frac{3}{2}} \sqrt{\frac{\eta_l \rho_l}{\pi \mu_q \rho_q}} \quad (3.7)$$

In diesem Ansatz werden jedoch die Energieverluste der Welle nicht berücksichtigt. Diese lassen sich nach Rodahl et al. mit der Güte der Schwingung beschreiben, welche dem Verhältnis aus gespeicherter und dissipierter Energie entspricht^[72]:

$$\Delta Q_0 = 2\pi \Delta \left(\frac{E_{\text{gespeichert}}}{E_{\text{dissipiert}}} \right) = -2Q_0^2 \sqrt{\frac{f_0}{\pi \mu_q \rho_q}} \sqrt{\eta_l \rho_l} \quad (3.8)$$

Der reziproke Wert der Güte wird als Dissipationsfaktor bezeichnet.

3.2.3 QCM-D-Technik

Die QCM-D-Technik, 1996 von Rodahl et al. entwickelt, zeichnet sich durch die simultane Bestimmung von Resonanzfrequenz und Dissipationsfaktor aus. Auf diese Weise können neben der Quantifizierung der Fremdmassenbelegung auch Aussagen über die Viskoelastizität der Schicht bzw. der überlagerten Flüssigkeit gemacht werden^[72–76]. Der Quarz wird durch einen Frequenzgenerator mit Wechselspannung im Bereich seiner Resonanzfrequenz angeregt und in Intervallen mittels eines computergesteuerten Relais vom Generator abgekoppelt. Nach dem

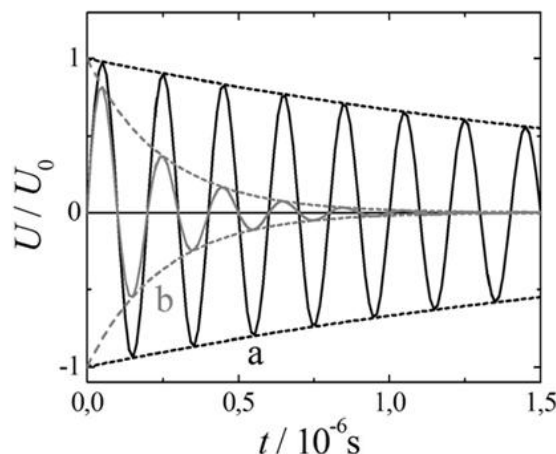


Abb. 3.10: Nach Gleichung 3.9 simulierte Spannungsverläufe der freien Schwingung eines Quarzes mit unterschiedlich starker Dämpfung. Die gestrichelten Linien stellen jeweils die einhüllenden Funktionen dar (nach Kastl, 2005).

Abkoppeln wird das Abklingverhalten der freien Schwingung des Quarzes durch ein digitales Oszilloskop aufgezeichnet. Der zeitliche Verlauf der Spannung $U(t)$ über den Quarz nach Abkopplung der Anregungsspannung zur Zeit $t = 0$ mit einer Anfangsspannung U_0 kann über eine exponentiell gedämpfte Sinusfunktion beschrieben werden^[75]:³

$$U(t) = U_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \sin(2\pi f t + \varphi) \quad (3.9)$$

Durch Kurvenanpassung der Abklingkurve mit Gleichung 3.9 kann die Resonanzfrequenz f und die Abklingzeit der gedämpften Schwingung τ ermittelt werden. In Abb. 3.10 sind schematisch die Spannungsverläufe zweier Schwingungen mit unterschiedlicher Dämpfung (durchgezogene Linien) und die entsprechenden einhüllenden Kurven (gestrichelte Linien) gezeigt.

Die Energieverluste durch die Dämpfung lassen sich durch den Dissipationsfaktor

$$D = \frac{E_{\text{dissipiert}}}{2\pi \cdot E_{\text{gespeichert}}} = \frac{1}{\pi f \tau} \quad (3.10)$$

beschreiben, der das Verhältnis aus gespeicherter und dissipierter Energie darstellt.

³ φ =Phase, τ =Abklingzeit

Der zeitliche Verlauf der Spannung über den Quarz bei periodischer Wiederholung von Anregung und Abkopplung ist in Abb. 3.11 dargestellt. Die zeitliche Auflösung lag bei dem in dieser Arbeit verwendeten System bei zwei bis drei Sekunden.

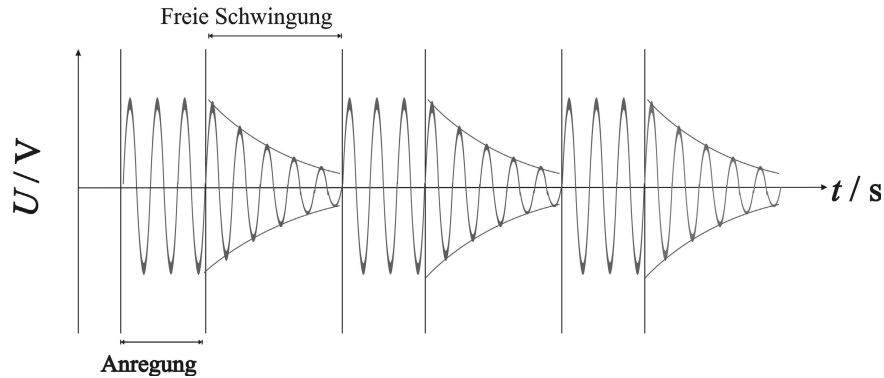


Abb. 3.11: Zeitlicher Verlauf der Anregungsphasen und der freien Schwingung des Quarzes bei der QCM-D-Technik. Wiederholte Anregung zur Schwingung, anschließende Abkopplung und Detektion der freien Schwingung führt zur zeitaufgelösten Bestimmung der Resonanzfrequenz f und des Dissipationsfaktors D (nach Kastl, 2005).

3.2.4 Experimenteller Teil

Der für QCM-D-Messungen verwendete Aufbau ist in Abb. 3.12 dargestellt. Der Quarz ist in der Meßkammer zwischen zwei Dichtringen eingespannt. Da die obere Elektrode mit Silberleitkleber leitend mit der Unterseite des Quarzes verbunden wurde, konnte die Kontaktierung beider Elektroden von unten erfolgen. Die Oberseite stand mit dem Analyten in Kontakt. Über Federkontakte wurde der Quarz mit einem externen Frequenzgenerator verbunden und nahe seiner Resonanzfrequenz zur Schwingung angeregt. Ein computergesteuertes Relais trennte nach Anregung des Quarzes über einen Zeitraum von etwa $1 \cdot 10^{-3}$ s den Signalgenerator vom Quarz. Ein digitales Oszilloskop detektierte den Spannungsabfall $U(t)$ der freien Schwingung über einen Zeitraum von $0,5 \cdot 10^{-3}$ s. Die Berechnung der Resonanzfrequenz und der charakteristischen Abklingzeit erfolgte durch nicht-lineare Kurvenanpassung an die Daten mit Hilfe eines Computers.

Die Messkammer befand sich in einem auf 20°C temperierten Faradaykäfig und

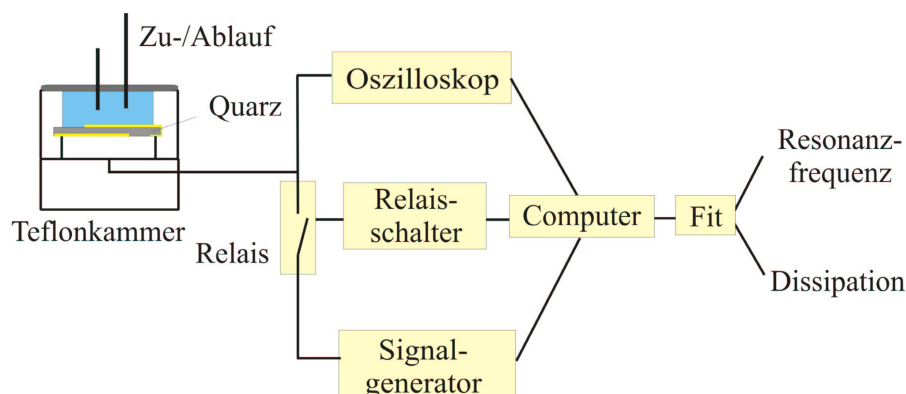


Abb. 3.12: Schematischer Aufbau der QCM-D. Die Messkammer befand sich in einem auf 20 °C temperierten Faradaykäfig (nicht gezeigt). Die Zugabe der Probe erfolgte mit einer Hamilton-Spritze in das Eppendorf-Gefäß.

wurde mit einem Deckel luftblasenfrei verschlossen. Durch einen Zu- und Ableitungsschlauch im Deckel wurde die Meßkammer mit einem Eppendorf-Gefäß außerhalb des Käfigs zu einem geschlossenen Kreislauf verbunden. Nach Zugabe der entsprechenden Proben in das Eppendorf-Gefäß, konnten diese mittels einer peristaltischen Pumpe in die Messkammer transportiert werden.

3.3 Messung der Protonenpumpaktivität von *Bacteriorhodopsin*

3.3.1 Messung lichtinduzierter Protonenströme

Die in dieser Arbeit gemessenen lichtinduzierten Stromdichten liegen im Bereich von wenigen bis zu einigen hundert Nanoampere. Zur Messung kleiner Ströme wird i. A. ein Stromverstärker, in diesem Fall der *428 Current Amplifier* der Firma Keithley (Germering) eingesetzt. Die Messung erfolgt dabei unter Strom-Spannungsumwandlung, wobei Verstärkungsfaktoren zwischen 10^3 und 10^{11} am Gerät gewählt werden können. Der geflossene Strom kann anschließend über diesen Verstärkungsfaktor berechnet werden. Zur Aufzeichnung der Meßwerte auf einem Computer wurde eine A/D-Wandlerkarte der Firma National Instruments (München) verwendet. Bei der Steuersoftware handelt es sich um ein Standard-

Labview-Programm zur Strommessung, das zur Anpassung an die gewählten Meßbedingungen geringfügig verändert wurde. Bei allen Versuchen befand sich der komplette Aufbau in einem abgedunkelten Faraday-Käfig. Da sich der experimentelle Aufbau je nach Verwendung von Goldelektroden oder porösem Aluminat unterscheidet, werden die entsprechenden Meßbedingungen im folgenden einzeln geschildert.

3.3.1.1 Aufbau bei Adsorption an nano-BLMs

Für elektrische Messungen wurde das poröse Substrat zwischen zwei Teflon-Kammern eingespannt. Da diese beiden Kammern jeweils eine Bohrung besitzen, ist ein Durchfluß von der einen Kammer durch die Poren des Substrats in die andere Kammer möglich. Die Abdichtung erfolgte mit Dichtringen aus NBD (Nitril-Butadien-Kautschuk) oder Kalrez®. Für Impedanzmessungen wurde in jede Kammer ein platinierter Platindraht eingetaucht. Bei den Photostrommessungen befanden sich diese außerhalb der Meßkammern, wurden aber über Salzbrücken leitend verbunden.

Die Belichtung des Substrats war über ein Sichtfenster in der *cis*-Kammer möglich. Bei der Adsorption von Purpurmembranen wurde dazu eine Halogenlampe (KL 2500, Opto Sonderbedarf GmbH) verwendet, deren Licht mit einem 515 nm-Kantenfilter gefiltert wurde. Über einen Lichtleiter wurde das Licht zur Messkammer geleitet, wobei sich zwischen zwei Lichtleiterstücken ein mechanischer Blendenverschluß zum manuellen Ein- und Ausschalten befand. Die relative Lichtintensität wurde über eine Dimmfunktion der Lampe geregelt, wobei die höchste Lampeneinstellung einer Beleuchtungsstärke von 270 Lux entsprach. Zur Aufnahme von Aktionsspektren wurden Interferenz-Bandfilter in den Strahlengang integriert (AHF Analysentechnik, Tübingen). Die dabei erhaltenen Stromdichten wurden um einen Faktor, der das Lampenspektrum berücksichtigt, korrigiert.

Zur Belichtung der *Chlamydomonas*-Zellen wurde eine blaue Leuchtdiode (Luxeon Star/O, 455 nm, Conrad-Elektronik) verwendet. Sie wurde statt des Licht-

leiters vor dem Sichtfenster in der Teflon-Kammer platziert und lieferte eine Beleuchtungsstärke von 20 Lux. Die Leuchtdiode wurde über eine in der Elektronik-Werkstatt angefertigte Steuereinheit an- und ausgeschaltet.

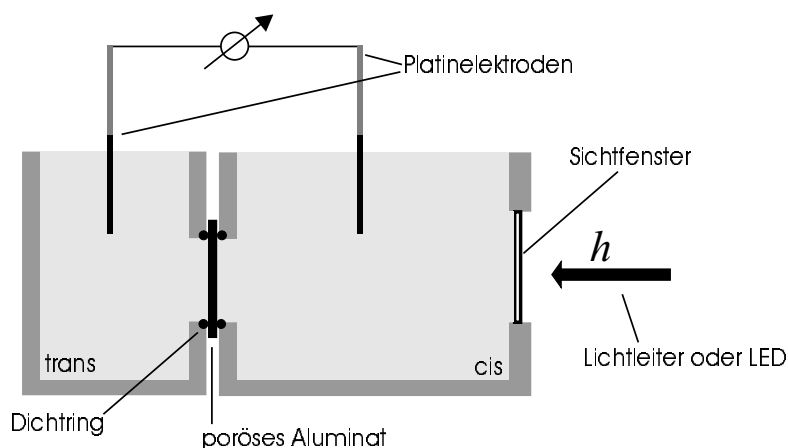


Abb. 3.13: Aufbau zur Aufnahme von Impedanzspektren von porösen Aluminaten. Der gleiche Aufbau wurde zur Messung lichtinduzierter Ströme verwendet. Jedoch befanden sich die Platinelektroden bei den Photostrommessungen außerhalb der Messkammern und wurden über Salzbrücken leitend verbunden.

3.3.1.2 Aufbau bei Adsorption an Goldelektroden und geschlossenen Poren

Bei Photostrommessungen, in denen Goldelektroden oder Aluminate mit geschlossenen Poren als Substrat verwendet wurden, diente der bereits in Abb. 3.8 gezeigte Aufbau. Der Lichtleiter bzw. die Leuchtdiode wurden dabei über dem horizontal eingebauten Substrat platziert, so daß die Belichtung in diesem Fall von oben erfolgte. Ansonsten wurde wie oben beschrieben verfahren.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Isolierung der Purpurmembran aus *Halobacterium salinarium*

Die Isolierung der Purpurmembran erfolgte nach einer Praktikumsvorschrift. Die Bakterienzellen (Wildtypstamm S9) wurden bis zu einer OD₅₆₈ von 1,4 bei 37°C unter Schütteln (Rundschüttler, 100 rpm) in Normalmedium (1 l enthält 250 g NaCl, 20 g MgSO₄ x 7 H₂O, 2 g KCl, 3 g Trinatriumcitrat x 2 H₂O, 10 g Oxoid-Peptone, pH = 7,0) kultiviert. Da hohe Sauerstoff-Konzentrationen die Bacteriorhodopsin-Biosynthese reprimieren, wurden die Zellen unter semianaeroben Bedingungen, d. h. ohne zusätzliche Belüftung kultiviert. Als Kulturgefäße dienten 2-l-Erlenmeyerkolben, die mit je 1 l Medium befüllt wurden. Insgesamt wurden 9 l Zellsuspension aufgearbeitet.

Zunächst wurden die Zellen 15 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert (GS3, Sorvall). Die purpurfarbenen Pellets wurden mit 1 ml 4 M NaCl aufgenommen, mit ca. einer Spatelspitze DNase I (Bovine Pancreas, 400-800 Kunitz units/mg Protein) versetzt. Nach Verdünnung mit Wasser im Verhältnis 1:4 wurde solange bei Raumtemperatur gerührt (ca. 1 h), bis die Lösung keine schleimige Konsistenz mehr aufwies. Anschließend wurde über Nacht gegen entionisiertes Wasser dialysiert. Am nächsten Tag wurden die Zellmembranen 60 min lang bei 40000 rpm abzentrifugiert (TFT 4594, Kontron), pro Röhrchen in 1,5 ml 50 mM Tris-Puffer, pH 7,5 aufgenommen und durch Pottern resuspendiert. Anschließend wurden die Zellmembranen durch Dichtegradienten-Zentrifugation im Sucrosegradienten (20-45 w%) fraktioniert. Der Gradient wurde in SW-28-Röhrchen (Beckmann) durch Mischen von 16 ml 45 w% Sucrose mit 18 ml 20 w% Sucrose in einem Gradientenmischer gebildet. Ungefähr 2-3 ml der Membransuspension wurden vorsichtig auf den Gradienten geschichtet und ca. 14 h bei 28000 rpm im TST-28-Ausschwingrotor (SW 28, Beckmann) bei 15°C zentrifugiert (Zentrifuge ohne Bremse auslaufen lassen). Es wurden drei Banden erhalten: eine violette (Purpurmembran), eine braun-gelbe (braune Membran, sie enthält Cytochrom b und monomeres bR) und eine gelb-orange. Die violette Bande wurde mit einer Pa-

steurpipette isoliert und zweimal durch Ultrazentrifugation gewaschen, um den Zucker größtenteils zu entfernen. Dazu wurde je ein Zentrifugenröhrchen mit einer Bacteriorhodopsin-Fraktion mit Wasser aufgefüllt und 60 min bei 40000 rpm zentrifugiert (TFT 4594, Kontron)

Die Konzentrationsbestimmung durch Absorption bei $\lambda = 568 \text{ nm}$ (Extinktionskoeffizient $= 63000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) lieferte eine Konzentration von 6,44 mg/ml Bacteriorhodopsin bei einer Gesamtausbeute von 193 mg.

3.4.2 Vorbereitung der *Chlamydomonas*-Zellen

Um die durch Belichtung von *Chlamydomonas*-Zellen induzierten Photoströme messen zu können, ist eine kapazitive Kopplung von Zellmembran und nano-BLM notwendig. Die bei Pflanzenzellen normalerweise vorhandene Zellwand würde dies verhindern. Daher wurden alle Experimente mit dem Stamm *CW2* durchgeführt, der einen durch chemische Mutagenese erzeugten Zellwanddefekt aufweist. Die Zellwandbestandteile werden zwar produziert, aber bis auf die innerste Schicht nicht fest verankert, sondern ins Medium sezerniert^[77].

3.4.2.1 Kultivierung

Die Kultivierung erfolgte im Labor der Arbeitsgruppe Hegemann. Die Zellen wurden aus der Festkultur in Flüssigmedium überführt, bei 25°C unter Beleuchtung mit Weißlicht kultiviert (Rundschüttler, 120 rpm) und nach einigen Tagen noch während der logarithmischen Wachstumsphase geerntet. Das Kulturmedium war ein modifiziertes Hochsalz-Acetat-Medium (HSM) nach Sueoka et al.^[78], das sich wie folgt zusammensetzte:

KH_2PO_4	6,8 mM
K_2HPO_4	6,2 mM
CaCl_2	100 μM
MgSO_4	81 μM
NH_4Cl	9,3 mM
NaOAc	15 mM
Sorbitol	250 mM
Hefeextrakt(Difco)	0,3 % (w/v)
Agar-Agar (IMA)	0,9 % (w/v)
Spurenelementelsg. nach Hutner et al. ^[79]	0,1 % (w/v)
pH-Wert	6,8

3.4.2.2 Umwandlung in Gameten

Unter Kohlenstoff- und Stickstoff-Mangelbedingungen differenzieren *Chlamydomonas*-Zellen zu Gameten. Diese weisen gegenüber vegetativen Zellen eine erhöhte Lichtempfindlichkeit auf. Einen Tag bevor die Zellen in den Photostrommessungen verwendet wurden, wurden sie zur Differenzierung zunächst abzentrifugiert (2200 rpm, Rotina 48 R, Hettich) und dann in modifiziertem „Nitrogen-deficient Minimal Medium“ (NMM) nach Foster et al.^[58] aufgenommen:

KH_2PO_4	3,4 mM
K_2HPO_4	3,1 mM
CaCl_2	100 μM
MgSO_4	81 μM

Der pH-Wert betrug 6,8. Anschließend wurden die Zellen bis zur Photoselektion am nächsten Tag unter Weißlicht geschüttelt.

3.4.2.3 Photoselektion

Die in Gameten überführte Suspension der Zellen in NMM (pH 6,8) wurde in Reagenzgläser mit spitz zulaufendem Boden gefüllt und dann am Fenster dem Tageslicht ausgesetzt. Nach einiger Zeit sammelten die Zellen sich am Boden des Glases (negative Phototaxis). Der Überstand wurde abgenommen und das

Reagenzglas mit frischem NMM-Puffer (pH 6,0) aufgefüllt. Diese Photos Selektion wurde einmal wiederholt und die Zellen in wenigen Millilitern NMM (pH 5,0) aufgenommen.

3.5 Präparative Methoden

3.5.1 Herstellung von porösem Aluminat

3.5.1.1 Grundlagen der Herstellung poröser Aluminate

Aluminium ist sowohl in Wasser als auch an Luft stets mit einer Oxidschicht überzogen. Die Ausbildung dieser Oxidschicht ist auf folgende Reaktion zurückzuführen:



Die native Oxidschicht erreicht eine Dicke von nur wenigen Nanometern, da sie die Reaktionspartner voneinander trennt und die Reaktion so zum Erliegen bringt (Passivierung). Der Ladungstransport kann jedoch durch das Anlegen einer äußeren Spannung an das Aluminium aufrecht erhalten werden. Dabei finden an den Elektroden folgende Reaktionen statt:



Während an der Kathode Protonen reduziert werden, findet an der Metall/Oxid-Grenzfläche die Oxidation von Al zu Al^{3+} statt. Das gebildete Al^{3+} führt entweder zur Oxidbildung mit den an die Metall/Oxid-Grenzfläche gewanderten O^{2-} - bzw. OH^- -Ionen oder es driftet aufgrund des angelegten Feldes zur Oxid/Elektrolyt-Grenzfläche. Die Art des entstehenden Oxids hängt vom verwendeten Elektrolyten ab:

- Wird ein Elektrolyt verwendet, der das gebildete Oxid nicht auflöst, entsteht ein massives, sog. Barriereoxid. Es wächst solange, bis die angelegte Spannung nicht mehr ausreicht, um den Ionenstrom durch das Oxid aufrechtzuerhalten. Das Oxidwachstum findet aufgrund des Transports von Al^{3+} einerseits und $\text{O}^{2-}/\text{OH}^-$ andererseits an beiden Oxidgrenzflächen statt. Da der Ionenstrom zudem in Bereichen dünnerer Oxidschichten wegen des größeren

elektrischen Feldes stärker ausgeprägt ist, werden anfängliche Unebenheiten im Barriereoxid eingeebnet. Für diesen Zweck verwendbare Elektrolyte sind z. B. Borsäure oder Citronensäure.

- In Elektrolyten, in denen Al_2O_3 relativ langsam aufgelöst wird, bildet sich eine poröse Oxidschicht. Die Bildung des Oxids findet in diesem Fall nur an der Metall/Oxid-Grenzfläche statt, da die durch das Oxid wandernden Al^{3+} -Ionen an der Oxid/Elektrolyt-Grenzfläche direkt in den Elektrolyten übergehen. Der Porendurchmesser kann über die Wahl des Elektrolyten (z. B. Oxalsäure, Phosphorsäure) gesteuert werden.
- Bei Verwendung eines Elektrolyten, der das Oxid mit hoher Auflösungsrate angreift, kommt es zum Elektropolieren der Aluminiumoberfläche. Dabei wird durch die ständige Bildung und Auflösung von Al_2O_3 die Oberfläche geglättet. Es entsteht ein reflektierendes Substrat mit einer dünnen, planaren Oxidschicht^[80].

In Abb. 3.14 sind die Abläufe, die bei der Verwendung von schwach auflösenden Elektrolyten zur Porenbildung führen, im Detail gezeigt. Abb. 3.15 zeigt die zugehörige Strom-Zeit-Kennlinie. Zunächst bildet sich eine Barriereoxidschicht aus, die zu einem Abfall des Stromflusses führt (Phase 1). Aufgrund von Inhomogenitäten im Aluminium kommt es zu Fluktuationen in der Dicke des gebildeten Oxids. Das von außen angelegte elektrische Feld weist an den Vertiefungen eine höhere lokale Feldstärke auf. Dies führt einerseits durch stärkere Polarisierung der Al-O-Bindungen zur schnelleren Auflösung, andererseits durch den höheren Ionenfluß zur verstärkten Bildung des Oxids. Vorhandene Unebenheiten werden nicht wie beim Elektropolieren eingeebnet, sondern verstärkt und dienen als Keime für die Porenbildung (Phase 2). Der Strom steigt nun an, bis die ganze Substratoberfläche mit Poren bedeckt ist und diese sich gegenseitig in ihrem horizontalen Wachstum beschränken (Phase 3). Der nun folgende nahezu konstante Stromverlauf ist auf ein Gleichgewicht zwischen Oxidauflösung an der Oxid/Elektrolyt-Grenzfläche und Oxidbildung an der Oxid/Metall-Grenzfläche der Porenböden zurückzuführen (Phase 4).

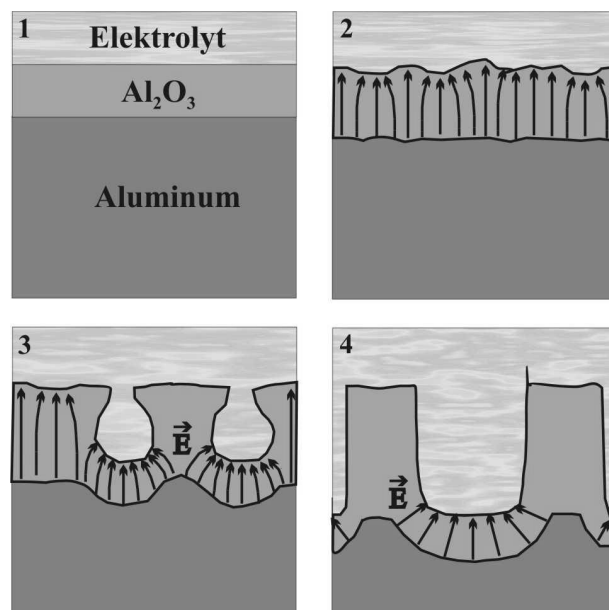


Abb. 3.14: Kinetik des Porenwachstums: 1. Bildung eines Barriereoxids, 2. Entstehung von Vertiefungen, 3. Bildung der ersten Poren, 4. Porenwachstum.

Die leichte Abnahme des Stromes über einen längeren Zeitraum ist bedingt durch Konzentrationsänderungen der Ätzlösung innerhalb der Poren^[80,81].

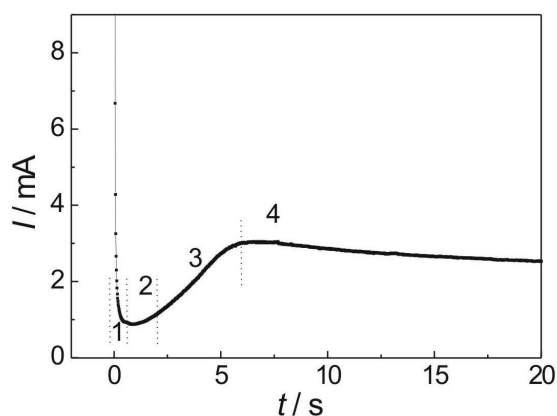


Abb. 3.15: Stromverlauf beim Anodisierungsprozeß von Aluminium in 0,3 M Oxalsäure. Die Vorgänge, die zu diesem Stromverlauf führen, sind in Abb. 3.14 gezeigt.

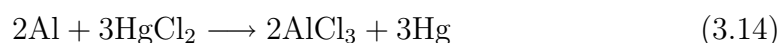
Ungeordnete und geordnete Porenstruktur Die Verteilung der Poren auf der Oberfläche des Substrats basiert auf der unregelmäßigen Oberflächenmorphologie. Erst im Laufe des Anodisierungsprozesses geht das ungeordnete Wachstum aufgrund von abstoßenden Kräften zwischen den Poren in ein geordnetes mit einer

hexagonalen Porenanordnung über. Man erhält folglich ein Substrat mit ungeordneter Porenstruktur an der Oberfläche und geordneter in der Tiefe. Wenn man das im ersten Schritt erzeugte Oxid ablöst, erhält man eine hexagonal vorstrukturierte Anordnung von Vertiefungen. Diese können in einem zweiten Anodisierungsprozeß als Keime für die Porenbildung dienen. Die entstehende Oxidschicht weist von Anfang an eine hexagonale Porenanordnung auf^[80, 82].

Einfluß der Anodisierungsparameter Die Eigenschaften der porösen Oxidschichten können durch Variation einiger Parameter in einem gewissen Rahmen verändert werden:

- **Anodisierungsdauer** Die Porentiefe hängt von der Dauer des Ätzprozesses ab. Beispielsweise wurden für Oxalsäure bei einer Spannung von 40 V Wachstumsraten von 1-2 $\mu\text{m}/\text{h}$ gefunden. Für Phosphorsäure (160 V) liegt dieser Wert bei 4-5 $\mu\text{m}/\text{h}$ ^[80, 83, 84].
- **Anodisierungsspannung** Die Schichtdicke des Oxids an den Porenböden ist konstant, ist aber proportional zur Anodisierungsspannung. Der Proportionalitätsfaktor wurde zu 1,3 nm/V bestimmt. Des weiteren können auch Porenabstand und -durchmesser über die angelegte Spannung eingestellt werden. Der Abstand der Poren wächst mit 2,6 nm/V. Die bislang erreichten Porendurchmesser liegen im Bereich von 10-400 nm^[85].
- Niedrige Temperaturen stellen kleine Wachstumsraten sicher, was die Ausbildung einer hexagonalen Struktur durch Selbstorganisation begünstigt. Daher wurden alle Ätzungen bei 2°C durchgeführt.

Abtrennen des Aluminiums und Öffnen der Porenböden Für die Präparation von nano-BLMs wurden ausschließlich Substrate mit durchgehend geöffneten Poren verwendet. In einem ersten Schritt wurde dazu das überschüssige Aluminium durch Inkubation in einer gesättigten HgCl_2 -Lösung entfernt. Die Auflösungsreaktion kann durch folgende Gleichung beschrieben werden:



Im Anschluß kann das freiliegende Barriereoxid durch chemisches Ätzen, z. B. mit Phosphorsäure entfernt werden. Es entsteht eine siebartige Struktur.

3.5.1.2 Herstellung von porösem Aluminat

Zur Herstellung der porösen Aluminate wurden hochreine Aluminiumfolien (Goodfellow/99,999 %/Dicke 0,5 mm/2·2 cm²) verwendet. Diese wurden zunächst elektropoliert und dann anodisiert. Für die Präparation von nano-BLMs wurde zusätzlich das überschüssige Aluminium abgetrennt und die Porenböden geöffnet^[80].

Elektropolieren Vor der Anodisierung wurden die Aluminiumfolien mit Ethanol gespült und dann zur Glättung der Oberfläche dreimal für etwa 40 s bei einer Temperatur von 70°C elektropoliert. Als Elektrolyt diente ein Gemisch aus Schwefelsäure (konz.), Phosphorsäure (85%ig) und Wasser im Massenverhältnis 2:2:1. Anschließend wurden die Substrate gründlich mit Reinstwasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

Herstellung ungeordneter Poren Ungeordnete Poren wurden durch einmalige Anodisierung der elektropolierten Substrate erhalten. Sie wurden dazu in die in Abb. 3.16 skizzierte Ätzapparatur eingebaut. Die Aluminiumfolie wird auf eine Kupferplatte aufgelegt und über diesen Kontakt als Anode geschaltet, als Kathode dient ein in den Elektrolyten eintauchendes Platinnetz. Ein Rührer gewährleistet, daß die Zusammensetzung des Elektrolyten an der Probenoberfläche konstant bleibt. Die Apparatur wird durch einen Styropor-Mantel thermisch isoliert, wobei die Temperatur über ein Peltier-Element mit angeschlossenem Kühlwasserkreislauf reguliert werden kann.

Die Anodisierung erfolgte entweder mit Oxalsäure (0,3 M) bei einer Spannung von 40 V oder mit Phosphorsäure (5 w%) bei einer Spannung von 160 V bei jeweils 2°C. Die Ätzdauer variierte zwischen drei Stunden und drei Tagen. Nach der Anodisierung wurden die Substrate gründlich mit Reinstwasser gespült.

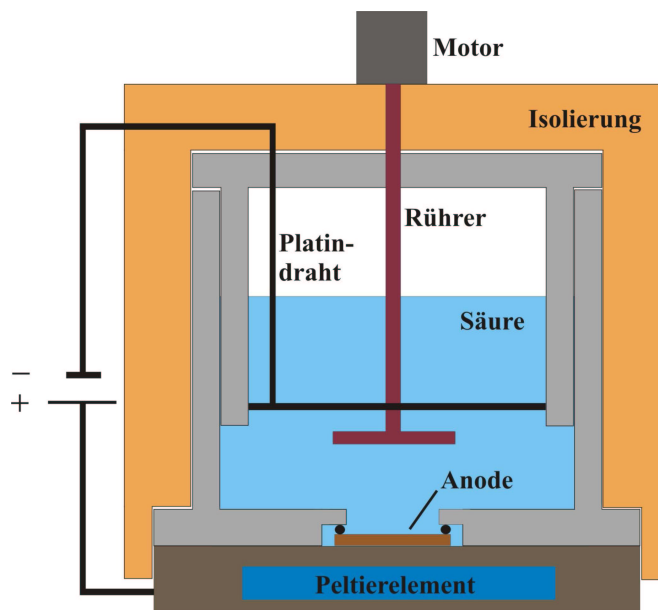


Abb. 3.16: Schematische Darstellung der Ätzapparatur: Die Aluminiumfolie wird als Anode am Boden der Apparatur eingebaut. Eine detaillierte Beschreibung der Ätzapparatur ist bei Jessensky^[80] zu finden.

Herstellung geordneter Poren Zur Herstellung geordneter Poren wurde das in einem ersten Anodisierungsschritt gebildete poröse Oxid durch Einlegen in eine 70°C heiße, saure Chrom(VI)-Oxid-Lösung (1,8 w% CrO_3 / 7,06 w% H_3PO_4 (85%ig)) entfernt. Nach 5-6 Stunden wurden die Substrate zur Entfernung von Säureresten gründlich mit Reinstwasser gespült. Aufgrund der nun vorliegenden Vorstrukturierung stellte sich in einem anschließenden zweiten Anodisierungsschritt von Beginn an ein geordnetes Porenwachstum ein.

Ablösen des Aluminiums Zur Abtrennung des nicht oxidierten Aluminiumanteils des Substrats wurde es bei Raumtemperatur solange in einer gesättigten HgCl_2 -Lösung inkubiert, bis kein Aluminium mehr zu erkennen war.

Öffnen der Porenböden Das Ablösen des Barriereoxids erfolgte mit Hilfe einer 5 w%- H_3PO_4 -Lösung bei einer Temperatur von 30°C. Dabei wurde das Substrat mit der Seite der Porenböden, die sich durch einen ausgeprägten Glanz auszeichnet, auf die Wasseroberfläche gebracht. Der Vorteil dieses Vorgehens liegt darin, daß nicht die gesamte Porenstruktur mit der Ätzlösung in Kontakt kommt,

so daß ein chemisches Aufweiten der Poren weitestgehend verhindert wird. Der Porenöffnungsprozeß wurde beendet, sobald im Impedanzspektrum nur noch der Widerstand des verwendeten Elektrolyten zu beobachten war.

Aufputtern einer Goldschicht Um die porösen Substrate der Oberflächenmodifikation mit Thiolen zugänglich zu machen, wurden dünne Goldschichten einer Dicke zwischen 40 und 100 nm aufgesputtert. Nach der Reinigung der Substrate im Argon-Plasma wurde dazu der *Sputter Coater 108 auto* der Firma Cressington eingesetzt. Im Fall der durchgehend porösen Oxide wurde die Unterseite besputtert.

3.5.2 Präparation von *self-assembly*-Monoschichten auf Goldoberflächen

Goldelektroden oder goldbesputterte Aluminate wurden durch Inkubation bei Raumtemperatur in 1 mM ethanolischen Lösungen der jeweiligen Thiole funktionalisiert. Die Inkubationszeiten reichten von 1 h (Mercaptoethylamin, MEA) bis zur Inkubation über Nacht (Dipalmitoylphosphatidylthioethanol, DPPTE; Octadecanthiol, ODT). Vor Gebrauch wurden die Substrate gründlich mit Ethanol gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

3.5.3 Präparation von nano-BLMs

Mit DPPTE oder ODT funktionalisierte Aluminate wurden in die in Abb. 3.13 gezeigte Teflonzelle eingebaut. Beide Kompartimente wurden mit Puffer gefüllt. Anschließend wurden 10 μ l einer Lösung aus Diphytanoylphosphatidylcholin (DPhPC, 1 % w/v) und Octadecylamin (ODA, 0,025 % w/v) in n-Dekan auf die hydrophobisierte Oberfläche (*cis*-Seite) gestrichen.

3.5.4 Präparation von *painted membranes*

Mit DPTE funktionalisierte Goldelektroden wurden in die in Abb. 3.8 gezeigte Teflonkammer eingebaut. 10 μ l einer Lösung aus DPhPC (1 % w/v) und ODA (0,025 % w/v) wurden auf die trockene Elektrode getropft. Nach 2-minütiger Inkubationszeit wurde intensiv mit Puffer gespült, um das organische Lösungsmittel zu entfernen. Es bildet sich ein Lipidfilm aus, der wegen seiner Interferenzfarben als *painted lipid membrane* bezeichnet wird^[14].

3.5.5 Präparation von Polyelektrolyt-Schichten

Alle Polyelektrolyte wurden mit einer Konzentration von 10^{-2} bzw. $5 \cdot 10^{-2}$ monomol l⁻¹ in Reinstwasser gelöst und mit Schwefelsäure auf pH 5,6 eingestellt⁴. Folgende Polyelektrolyte wurden verwendet:

Polyanion:

- Polystyrolsulfonsäure(PSS), M=70000 g/mol, c= 10^{-2} monomol l⁻¹

Polykationen:

- Polyethylenimin(PEI), M=600 g/mol, c= 10^{-2} monomol l⁻¹
- Polyethylenimin(PEI), M=2000 g/mol, c= 10^{-2} monomol l⁻¹
- Polyethylenimin(PEI), M=750000 g/mol⁵, c= $5 \cdot 10^{-2}$ monomol l⁻¹
- Polydiallyldimethylammoniumchlorid(PDAC),
M=350000 g/mol , c= $5 \cdot 10^{-2}$ monomol l⁻¹

Die Polyelektrolyte wurden durch elektrostatische Adsorption auf einer Mercaptoethylamin- oder Mercaptoethylsulfonsäure-Monoschicht präpariert. Dazu wurden die Substrate mit Hilfe eines automatischen Dipapparates in die jeweilige Polyelektrolyt-Lösung und anschließend zum Spülen in Reinstwasser getaucht.

⁴1 Monomol=1 Mol einer Monomer-Einheit

⁵im folgenden als PEI 750K abgekürzt

Zum Aufbringen von Multischichten wurde der Vorgang abwechselnd mit Poly-anionen und Polykationen durchgeführt. Die Eintauchzeit betrug in jeder Lösung 30 min. Nach Adsorption der letzten Schicht wurde der Träger nochmals gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

3.5.6 Adsorption von Purpurmembranen auf funktionalisierten Goldelektroden/porösen Aluminaten

Vor der Zugabe von Purpurmembranen zur vorbereiteten Probe wurden sie mit Hilfe eines *Tip-Sonifiers* der Firma Branson (Danbury, CT) für 2 min unter Eiskühlung beschallt. Anschließend wurde davon soviel in den Probenpuffer gegeben, bis die gewünschte Konzentration erreicht war. Da sich die Purpurmembranlösung nur langsam im Puffer verteilte, wurde die Probe auf einem Magnetrührer platziert.

3.5.7 Präparation von Bacteriorhodopsin-haltigen Vesikeln nach der *reversed phase* Methode

Zur Rekonstitution von Bacteriorhodopsin in Vesikel wurde die *reversed phase* Methode verwendet. 1 mg der verwendeten Lipide wurden zusammen mit 1 ml Diethylether, 500 μ l Puffer und einem entsprechenden Volumen einer wässrigen Suspension der Purpurmembranfragmente in einen Spitzkolben pipettiert. Das Gemisch wurde 2 min lang unter Eiskühlung an einem Mikro-Tip (Branson Sonifier 250, Branson) beschallt. Anschließend wurde der Diethylether an einem Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur entfernt, bis sich eine gelartige Suspension bildete. Nun wurden weitere 500 μ l Puffer zugegeben, so daß eine Endkonzentration von 1 mg/ml Lipid resultierte. Der restliche Diethylether wurde durch 20minütiges Verdampfen am Rotationsverdampfer entfernt. Die zurückgekehrte rötliche Färbung zeigt den erfolgreichen Einbau des Bacteriorhodopsins in die Vesikel^[86]. Bei allen Versuchen wurde eine Lipidmischung aus 90 % Asolectin und 10 % DPPA verwendet.

4 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Aktivität des lichtaktivierten Proteins Bacteriorhodopsin in porenüberspannenden Membranen untersucht werden. Dazu mußte das Protein zunächst auf der Oberfläche des porösen Substrats immobilisiert werden. Für die Immobilisierung wurden die Stege zwischen den Poren mit einer dünnen Goldschicht besputtert und dann chemisch funktionalisiert. Da Purpurmembranfragmente eine negative Nettoladung aufweisen^[87–90] und auch Bacteriorhodopsin, rekonstituiert in negativ geladenen Lipidmembranen eine höhere Aktivität aufweist als in zwitterionischen^[91], wurde die Funktionalisierung so gewählt, daß die Immobilisierung des Proteins über elektrostatische Wechselwirkungen möglich war. Dabei wurden drei verschiedene Strategien verfolgt, die in Abb. 4.1 schematisch skizziert sind:

Bei der ersten Strategie wurde die Goldoberfläche durch Chemisorption einer Monolage aus Aminoalkanthiolen beschichtet. Träger der positiven Ladung war jeweils eine endständige Aminogruppe. Da der Ladungszustand dieser Gruppe pH-abhängig ist, durfte der verwendete pH-Wert nicht zu hoch gewählt werden. Es wurden zwei Alkanthiole eingesetzt, die sich in ihrer Kettenlänge unterscheiden, Mercaptoethylamin (MEA) und Mercaptoundecylamin (MUA).

Der erste Schritt der zweiten Strategie bestand ebenfalls in der Chemisorption von Alkanthiolen. Anschließend fand zusätzlich eine Beschichtung mit Polyelektrolyt-Multischichten in einem *self-assembly*-Prozeß statt. Für die letzte Schicht in diesem Prozeß wurde jeweils ein Polykation gewählt, um wiederum die Adsorption über elektrostatische Wechselwirkungen sicherzustellen.

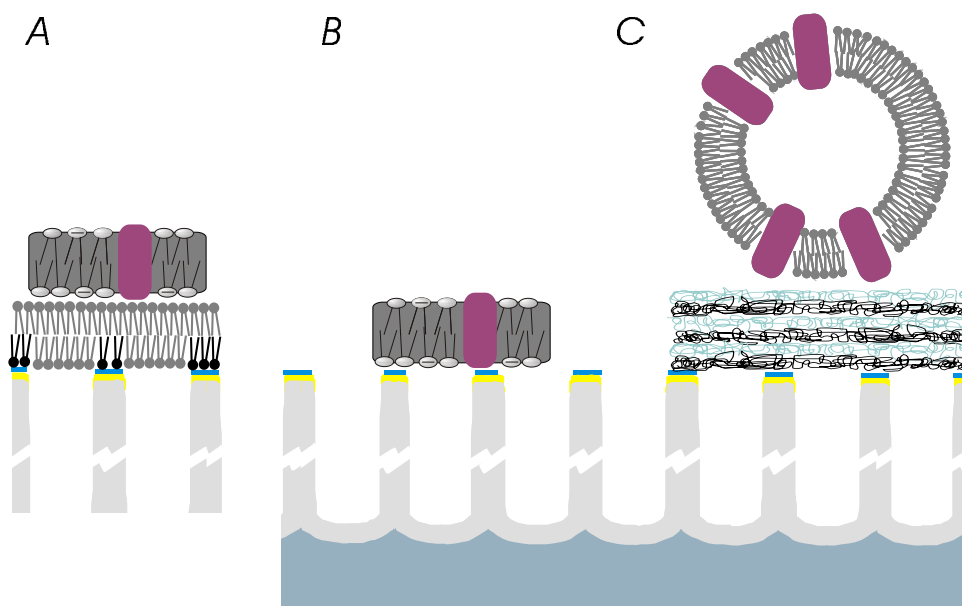


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der drei verwendeten Strategien zur Oberflächenmodifikation: **A** PM-Fragmente adsorbiert an nano-BLMs **B** PM-Fragmente adsorbiert an Aminoalkanthiolschichten **C** Bacteriorhodopsin-haltige Vesikel adsorbiert an Polyelektrolytschichten.

Bei der dritten Strategie wurden zunächst sogenannte nano-BLMs auf dem Substrat erzeugt. Dazu wurde ebenfalls in einem ersten Schritt eine Alkanthiolschicht an die Goldoberfläche chemisorbiert. Wahlweise wurde dazu auch ein Phospholipid mit einer endständigen Thiolgruppe genutzt. Anschließend wurde die zweite Monoschicht durch Aufstreichen einer Lösung eines Phospholipids, Diphytanoylphosphatidylcholin (DPhPC) und eines positiv geladenen Detergenzes, Octadecylamin (ODA) in n-Dekan präpariert. In diesem Fall war das Detergenz der Träger der für die Adsorption wichtigen positiven Ladung der Oberflächenbeschichtung.

Zunächst wurde Bacteriorhodopsin auf Goldelektroden immobilisiert, um die Eignung der drei Strategien im Hinblick auf das Adsorptionsverhalten und die Aktivität des Proteins an der Oberfläche zu bewerten.

4.1 Theoretische Betrachtungen zur „aktiven Fläche“

Zur Charakterisierung von Lipiddoppelschichten wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels Impedanzspektroskopie die Membrankapazitäten bestimmt. Zur Evaluation der Aktivität von Bacteriorhodopsin auf den porösen Aluminaten war die lichtinduzierte Stromdichte ein wichtiger Parameter. Beides sind flächenbezogene Größen. Die Normierung auf die Fläche ist wie bei allen flächenintensiven Meßgrößen insofern wichtig, daß zum einen die Ergebnisse, die bei Verwendung unterschiedlich dimensionierter Substrate erhalten werden, vergleichbar werden. Zum anderen sind so auch Vergleiche mit Literaturwerten möglich. Doch welche Fläche wird zur Normierung der beiden elektrischen Größen herangezogen? Bei planaren Substraten, z. B. einer Goldelektrode oder einer Schwarzen Membran ist die Antwort offensichtlich. Beim erstgenannten System ist es die Elektrodenfläche, beim zweiten die Größe des Lochs in der Trennwand. Bei porösen Substraten, wie den in dieser Arbeit verwendeten Aluminaten sind zwei Varianten der Flächennormierung denkbar. Einerseits könnte man wie bei den genannten Systemen die gesamte Fläche, also die geometrische Fläche des Dichtrings, zugrunde legen. Andererseits wäre es vorstellbar, nur den porösen Anteil der Gesamtfläche zu verwenden, da z. B. die Ionenleitung nur innerhalb der Elektrolyt-gefüllten Poren stattfinden dürfte. Die beiden Möglichkeiten basieren auf zwei Modellen, die im folgenden als *parallel-layer*- bzw. *series-layer*-Modell bezeichnet werden. Sie unterscheiden sich im Wesentlichen darin, ob zwischen den einzelnen Poren elektrischer Kontakt besteht. Wird dies bejaht, so wird das System bei der Aufstellung eines Ersatzschaltbildes in serielle Schichten senkrecht zur Stromrichtung eingeteilt, im entgegengesetzten Fall parallel dazu. Diese Vorgehensweise wird in Abb. 4.2 schematisch dargestellt.

parallel-layer-Modell

Für das *parallel-layer*-Modell ergibt sich aufgrund des oben skizzierten Vorgehens das in Abb. 4.3 A gezeigte Ersatzschaltbild. Sowohl die Lipiddoppelschicht

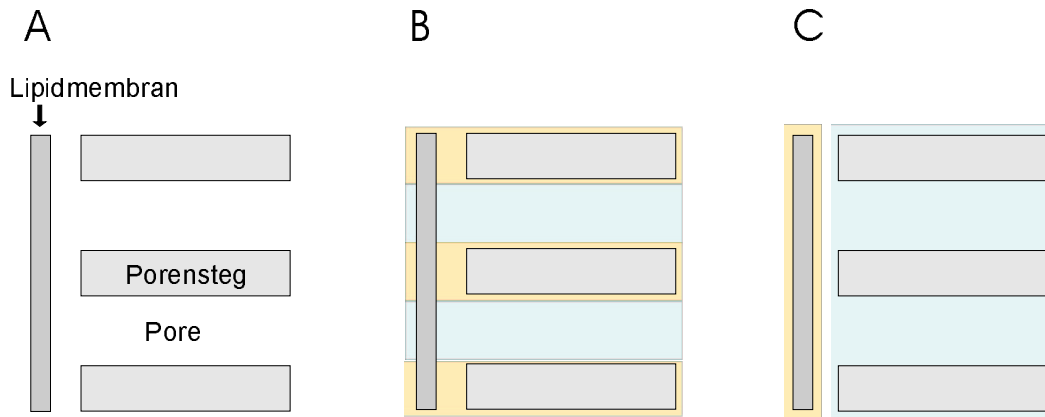


Abb. 4.2: **A** Schematische Darstellung eines Membran-überspannten porösen Aluminats. **B** *parallel-layer*-Modell: Einteilung in Schichten parallel zur Stromrichtung. **C** *series-layer*-Modell: Einteilung in Schichten senkrecht zur Stromrichtung.

als auch das Aluminiumoxid werden darin als Parallelschaltung aus Kapazität C und Leitfähigkeit G dargestellt, wobei die Indizes m für die Membran bzw. ox für das Oxid verwendet werden. Dem Teil der Membran, der sich auf den Porenstegen befindet wird die Leitfähigkeit G_{m1} zugeordnet, dem Teil, der sich über den Poren befindet die Leitfähigkeit G_{m2} . Die Leitfähigkeit der Elektrolyt-gefüllten Poren wird als G_p bezeichnet. Bezieht man sich auf den Gleichstromfall,

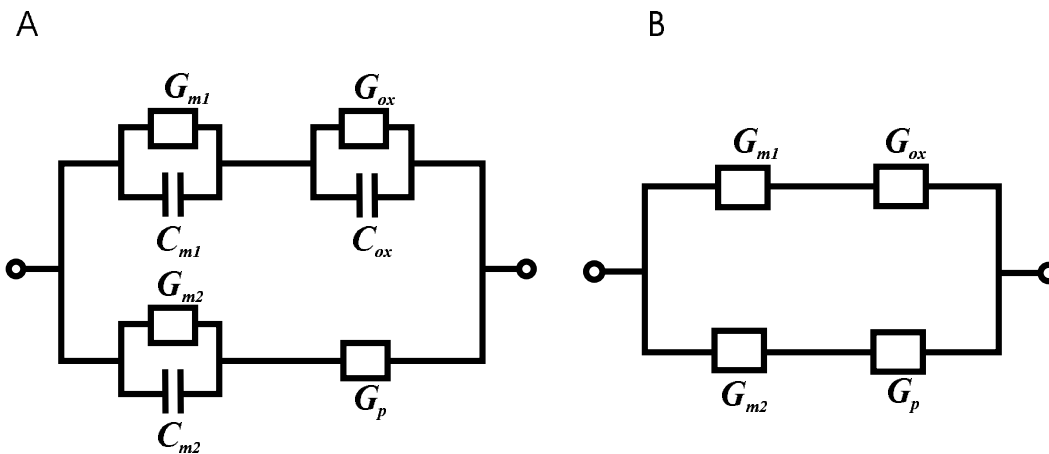


Abb. 4.3: **A** Ersatzschaltbild, das sich für porenüberspannende Membranen nach dem *parallel-layer*-Modell ergibt. G_{ox} =Oxidleitfähigkeit, C_{ox} =Oxidkapazität, G_m =Membranleitfähigkeit, C_m =Membrankapazität, G_p Leitfähigkeit in den Poren. **B** Vereinfachtes Ersatzschaltbild im Gleichstromfall.

so kann man die Darstellung auf die Leitfähigkeiten reduzieren. Das resultierende Ersatzschaltbild (Abb. 4.3 B) besteht aus zwei Zweigen, die jeweils aus zwei

Leitfähigkeiten bestehen, und nicht elektrisch miteinander verbunden sind. Bei in Reihe geschalteten Leitfähigkeiten wird das elektrische Verhalten wegen

$$\frac{1}{G_{ges}} = \frac{1}{G_1} + \frac{1}{G_2} \quad (4.1)$$

durch die jeweils kleinere Leitfähigkeit bestimmt. Im vorliegenden Ersatzschaltbild gelten folgende Relationen:

$$G_{ox} \ll G_m \quad \text{und} \quad G_m \ll G_p \quad (4.2)$$

Das Ersatzschaltbild kann daher zu dem in Abb. 4.4 dargestellten vereinfacht werden. Es besteht aus einer Parallelschaltung aus Oxidleitfähigkeit und dem Teil der Membranleitfähigkeit, die dem porenüberspannenden Teil der Membran zugeordnet wird. Da wiederum gilt $G_{ox} \ll G_m$, fließt der Strom hauptsächlich über

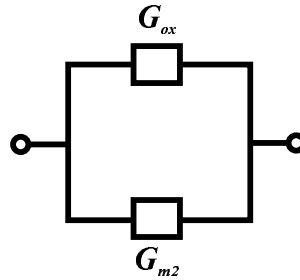


Abb. 4.4: Vereinfachtes Ersatzschaltbild für das *parallel-layer*-Modell nach Zusammenfassung der jeweils seriell geschalteten Elemente aus Abb. 4.3 B.

den unteren Zweig mit der Membranleitfähigkeit G_{m2} . Die zugehörige spezifische Leitfähigkeit für diesen Zweig ist definiert als:

$$G^{sp} = \frac{G_{m2}}{A_p} \quad (4.3)$$

mit A_p als poröser Fläche. Die Aufstellung eines Ersatzschaltbildes nach dem *parallel-layer*-Modell und die anschließende Vereinfachung macht deutlich, daß sich die spezifische Leitfähigkeit G^{sp} in diesem Modell durch Normierung mit der porösen Fläche ergibt. Dies verhält sich anders, wenn man das *series-layer*-Modell zugrunde legt.

series-layer-Modell

Beim *series-layer*-Modell wird das System in zwei Schichten eingeteilt, die im Ersatzschaltbild seriell verknüpft werden. Die erste Schicht ist in diesem Fall die Lipidmembran, die zweite ist das sogenannte Kanalfeld, bestehend aus dem porösen Substrat mit Elektrolyt-gefüllten Poren und Porenstegen. Die Membran wird erneut unterteilt in einen Teil, der sich auf den Porenstegen befindet mit der Leitfähigkeit G_{m1} und einen Teil, der die Poren bedeckt mit der Leitfähigkeit G_{m2} . Abb. 4.3 zeigt das komplette Ersatzschaltbild, sowie die Vereinfachung für den

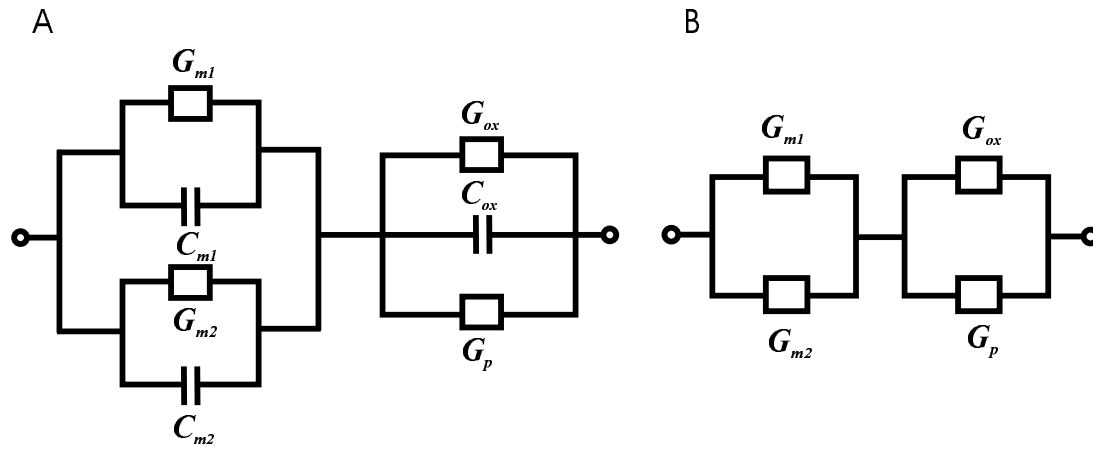


Abb. 4.5: **A** Ersatzschaltbild, das sich für porenüberspannende Membranen nach dem *series-layer*-Modell ergibt. G_{ox} =Oxidleitfähigkeit, C_{ox} =Oxidkapazität, G_m =Membranleitfähigkeit, C_m =Membrankapazität, G_p Leitfähigkeit in den Poren. **B** Vereinfachtes Ersatzschaltbild im Gleichstromfall.

Gleichstromfall, bei dem erneut nur die Leitfähigkeiten berücksichtigt werden. Die Indizes wurden parallel zur Beschreibung des *parallel-layer*-Modells verwendet. In der Parallelschaltung aus Porenleitfähigkeit G_p und Oxidleitfähigkeit G_{ox} kann letztere vernachlässigt werden, da gilt:

$$G_{ges} = G_{ox} + G_p \approx G_p \quad \text{mit} \quad G_p \gg G_{ox} \quad (4.4)$$

Dadurch ergibt sich das in Abb. 4.6 gezeigte Ersatzschaltbild. Eine Vereinfachung der Parallelschaltung der beiden Membranleitfähigkeiten ist auf diesem Wege nicht möglich. Sehr wohl lässt sich analog die Gesamtleitfähigkeit berechnen:

$$G_{ges} = G_{m1} + G_{m2} = G_m^{sp} \cdot A_{Steg} + G_m^{sp} \cdot A_p = G_m^{sp} \cdot (A_{Steg} + A_p) = G_m^{sp} \cdot A_{ges} \quad (4.5)$$

Die spezifische Leitfähigkeit in diesem Modell ergibt sich also – im Gegensatz zum *parallel-layer*-Modell – durch Normierung mit der gesamten Fläche.

Die Frage, welches Modell „richtig“ oder „falsch“ ist, kann hier nicht abschlie-

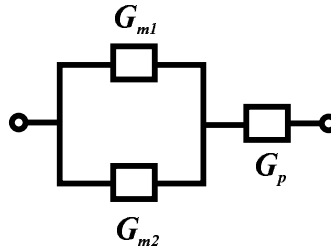


Abb. 4.6: Vereinfachtes Ersatzschaltbild für das *series-layer*-Modell. Das Kanalfeld wird aufgrund der wesentlich größeren Leitfähigkeit im Vergleich mit dem Oxid nur noch durch G_p beschrieben.

ßend beantwortet werden. Vielmehr gibt es sowohl für das eine als auch das andere Modell Argumente. Beispielsweise führte Drexler^[92] impedanzspektroskopische Messungen an Aluminaten mit geschlossenen Poren durch. Das Barriereoxid in diesem System wird elektrisch ebenfalls durch eine Parallelschaltung aus Kapazität und Leitfähigkeit beschrieben, so daß dieses System analog zu dem hier beschriebenen behandelt werden kann. Bei Vergleichen mit Impedanzspektren reiner Barriereoxide wurden keine Unterschiede festgestellt. Sie schloß daraus, daß das Kanalfeld nicht detektiert wird und daher die geometrische Fläche des Dicht-rings zur Flächennormierung herangezogen werden muß. Andererseits besteht ein wichtiger Unterschied zwischen den beiden Modellen darin, ob elektrischer Kontakt zwischen der Membranfläche auf den Porenstegen und den Poren besteht. Da die Stege durch Chemisorption mit Oktadekanthiol oder Dipalmitoylphosphatidylthioethanol modifiziert wurden, darf bezweifelt werden, ob dieser Kontakt besteht.

Um eine einheitliche Beurteilung aller Experimente zu gewährleisten, wurden im Rahmen dieser Arbeit alle flächenintensiven Größen auf die poröse Fläche bezogen, die sich aus der geometrischen Fläche des Dichtrings multipliziert mit der Porosität des Substrats ergibt.

4.2 Adsorptionsverhalten von Membranfragmenten an modifizierten Goldoberflächen

Um im Vorfeld die Eignung verschiedener Modifikationsstrategien für die Immobilisierung von Bacteriorhodopsin zu evaluieren, wurden Quarzmikrowaagemessungen durchgeführt. Diese werden im folgenden Kapitel im Detail geschildert. Im Gegensatz zu den porösen Substraten ist zu berücksichtigen, daß bei den Quarzmikrowaagemessungen eine planare Goldelektrode als unterstützendes Festkörpersubstrat dient. Bei der Übertragung der hier gewonnenen Ergebnisse auf die porösen Aluminiumoxide sollten resultierende Unterschiede, z. B. in der Oberflächenladungsdichte berücksichtigt werden.

4.2.1 Adsorption an geladene Thiolmonoschichten

Bei der ersten der drei geschilderten Strategien zur Immobilisierung von Bacteriorhodopsin wies die Quarzelektrode aufgrund der Chemisorption von Thiolen mit Aminfunktion eine positive Oberflächenladungsdichte auf. Der Adsorptionsprozeß von Purpurmembranfragmenten ist für die beiden verwendeten Aminoalkanthiole in Abb. 4.7 gezeigt. Es ist sowohl die Frequenzänderung als auch die Dissipationsänderung gegen die Zeit aufgetragen. Es ergaben sich maximale Frequenzänderungen von 320 bzw. 570 Hz und Dissipationsänderungen von 96 und $134 \cdot 10^{-6}$ für Mercaptoethylamin (MEA) bzw. Mercaptoundecylamin (MUA). Nach weiteren Zugaben konnten keine Frequenz- oder Dissipationsänderungen mehr beobachtet werden. Als dritte QCM-D-Messung ist in Abb. 4.7 zum Vergleich die Adsorption von Membranfragmenten an einer unmodifizierten Goldoberfläche dargestellt. Frequenz- bzw. Dissipationsänderungen von 80 Hz bzw. $20 \cdot 10^{-6}$ zeigen deutlich, daß auch an nicht modifizierten Goldelektroden unspezifische Adsorption stattfand. Die Wirkung der hohen Oberflächenladungsdichte bei den modifizierten Elektroden ist jedoch offensichtlich. Der Unterschied im Adsorptionsverhalten an MEA und MUA läßt sich durch die unterschiedliche Kettenlänge der beiden Thiole erklären.

Mit zunehmender Anzahl an C-Atomen nehmen auch hydrophobe und van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den Alkanen zu. Bei der MUA-Monoschicht könnte dies zu einer geordneteren, dichteren Packung der positiven Ladungen an der Oberfläche führen.

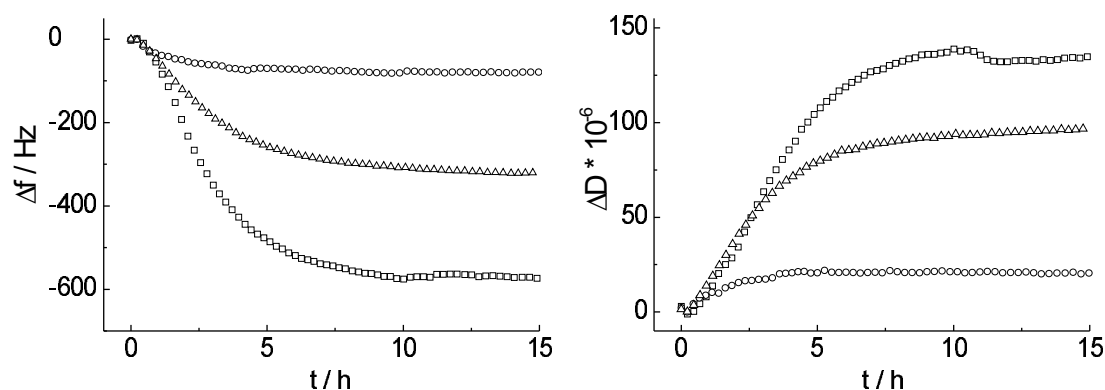


Abb. 4.7: Frequenz- und Dissipationsänderungen bei Adsorption von Purpurmembranen an eine MEA-Monoschicht (\triangle), an eine MUA-Monoschicht (\square) und an eine unmodifizierte Gold-elektrode (\circ). Die Messungen wurden in 10 mM BisTris/HCl, pH 5,6 durchgeführt. Es wurden PM-Fragmente mit einer Endkonzentration von $8 \cdot 10^{-3}$ mg/ml Protein zugegeben.

4.2.2 Adsorption an Polyelektrolyt-Schichten

Polyelektrolyte sind Polymere, die mehrere ionische Gruppen entlang der Kette tragen. Sie lassen sich nach dem Vorzeichen der Ladung in Polyanionen und Polykationen einteilen. Sie rückten in den letzten Jahren verstärkt in das Interesse wissenschaftlicher Untersuchungen, seitdem Decher 1997 die *layer-by-layer*-Technik zur Herstellung von Polyelektrolyt-Schichtsystemen beschrieb^[93]. Abb. 4.8 zeigt die Präparation einer solchen Multischicht, die sehr einfach in einem *self-assembly*-Prozeß durch alternierende Adsorption entgegengesetzt geladener Polyelektrolyte hergestellt werden kann. Der oben gegebenen Definition zufolge können neben synthetisch hergestellten Polyelektrolyten wie Polystyrolsulfonsäure (PSS), Polyethylenimin (PEI) oder Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDAC) auch biologische Polymere wie DNA, RNA oder viele Proteine als Polyelektrolyte bezeichnet werden. Daneben erwiesen sich auch andere geladene Nanopartikel (Latex-Kugeln, Nanoröhren, Metalloxidpartikel wie Fe_3O_4 , MnO_2 ,

TiO₂) sowie Lipiddoppelschichten mit hohem Anteil an geladenen Lipiden als geeignet, als Substrat in der *layer-by-layer*-Technik zu fungieren. Dementsprechend groß ist die Vielfalt an Polyelektrolyt-Schichtsystemen, die in der Literatur beschrieben werden^[94].

Für die Quarzmikrowaagemessungen wurden die Polyelektrolytschichten vor dem

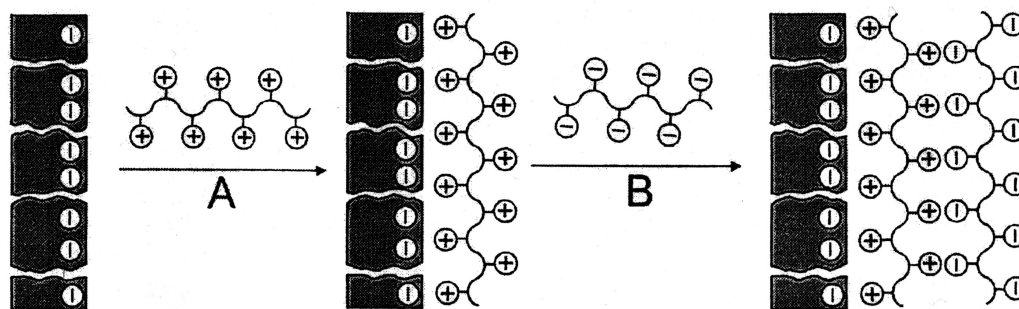


Abb. 4.8: *Layer-by-layer*-Adsorption von Polyelektrolyten auf einer porösen Oberfläche (nach Krasemann & Tieke^[95]).

Einbau des Quarzes in die Meßkammer präpariert. Auf die Kontrolle des Adsorptionsprozesses, z. B. mit Hilfe von schichtdickensensitiven Methoden wurde in dieser Arbeit verzichtet. Drexler zeigte jedoch durch Quarzmikrowaagemessungen die Zuverlässigkeit der *layer-by-layer*-Technik. Elektronen- und rasterkraftmikroskopische Untersuchungen^[92,96,97] zeigten zudem, daß die Poren poröser Aluminate nicht gefüllt, sondern von den Polyelektrolyt-Schichten überspannt werden. Bei früheren Untersuchungen zu Polyelektrolyt-beschichteten Goldoberflächen^[98] wurden durch die Adsorption von Purpormembranen keine signifikanten lichtinduzierten Ströme erzielt. Auf die Quantifizierung der Adsorption mit Hilfe der Quarzmikrowaagetechnik wurde daher in dieser Arbeit verzichtet. Bessere Ergebnisse lieferte ein anderer Ansatz, Bacteriorhodopsin auf den Polyelektrolyt-Schichten zu immobilisieren, bei dem das Protein in Vesikel rekonstituiert wurde. Da die Adsorption über elektrostatische Wechselwirkungen erreicht werden sollte, wurde für die Vesikel ein Anteil von 10-20% an negativ geladenen Phospholipiden verwendet.

Mit Hilfe der dissipativen Quarzmikrowaagentchnik ist es nicht nur möglich die Adsorption der Vesikel über die Frequenzänderung zu verfolgen. Die gleichzeitige Detektion der Dissipationsänderung macht es möglich, Aussagen über das Spreitverhalten der Vesikel zu machen. So konnten z. B. Keller et. al.^[99] je nach Oberfläche zwischen Adsorption intakter Vesikel und Ausbildung einer planaren Lipiddoppelschicht unterscheiden. Faiss et. al.^[100] zeigten, daß der Übergang von der Adsorption intakter Vesikel zum Spreiten der Vesikel durch Erhöhung der Oberflächenladungsdichte induziert werden kann.

Da es bei den im folgenden dargestellten Experimenten in erster Linie darum ging, zu klären, ob die bR-Vesikel auf einer Polyelektrolyt-Schicht spreiten, wurde jeweils nur eine Polykation-Schicht auf dem Quarz aufgebaut. Bei den späteren Aktivitätsmessungen auf den porösen Substraten wurden dagegen Multischichten aus alternierenden Polykation- und Anion-Lagen aufgebaut, um eine vollständige Bedeckung der Poren zu gewährleisten. Bei der Bewertung der Ergebnisse muß daher evtl. die durch Interkalation der Schichten bedingte Verringerung der Oberflächenladungsdichte berücksichtigt werden.

Für den Aufbau von Polyelektrolyt-Schichten wurde zunächst eine Monoschicht aus Mercaptoethansulfonsäure an die Goldelektrode chemisorbiert. Die dadurch negativ geladene Oberfläche war Ausgangspunkt für die Adsorption verschiedener Polykationen. Einige Versuche wurden mit einer Doppelschicht aus dem Polyanion Polystyrolsulfonsäure (PSS) und Polyethylenimin als Polykation durchgeführt. In diesem Fall wurde zunächst eine Mercaptoethylamin-Monoschicht chemisorbiert.

Abb. 4.9 zeigt exemplarisch den typischen Kurvenverlauf bei Adsorption bR-haltiger Vesikel an eine Polykation-Schicht, in diesem Fall an eine PDAC-Schicht. Die starke Frequenzänderung zeigt, daß die Vesikel zwar an die Oberfläche banden, die kontinuierliche Dissipationszunahme weist aber darauf hin, daß sie intakt blieben und zumindest nicht alle spreiteten. Das Experiment wurde mit weiteren Polykationen durchgeführt, um zu klären, ob evtl. die chemische Struktur der Polymere Einfluß auf den Adsorptions- und Spreitprozeß der Vesikel hat. Abb. 4.10

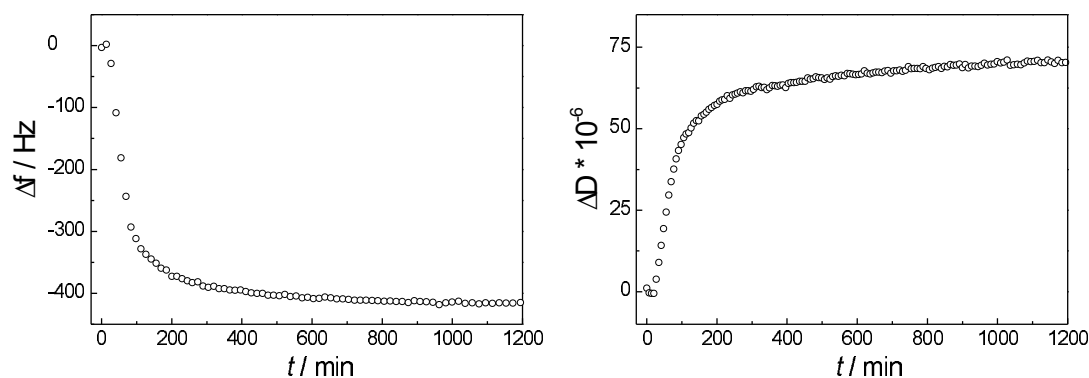


Abb. 4.9: Frequenz- und Dissipationsänderungen bei Adsorption von bR-haltigen Vesikeln an Polykationen, in diesem Fall an eine PDAC-Schicht. Die Lipidkonzentration im Kreislauf betrug 1,5 mg/ml. Die Messung wurde in 100 mM Na_2SO_4 durchgeführt.

zeigt eine Zusammenstellung der maximalen Frequenz- und Dissipationsänderungen bei Adsorption der bR-haltigen Vesikel an die einzelnen Polykationen. Es zeigte sich, daß alle verwendeten Polymere geeignet waren, die bR-haltigen Vesikel an der Oberfläche zu binden. Die größten Frequenz- und Dissipationsänderungen traten mit (400 ± 120) Hz bzw. $(82 \pm 10) \cdot 10^{-6}$ bei PDAC als Polykation auf. Ein Spreiten der Vesikel, angezeigt durch einen zweistufigen Prozeß, konnte bei keiner Messung beobachtet werden.

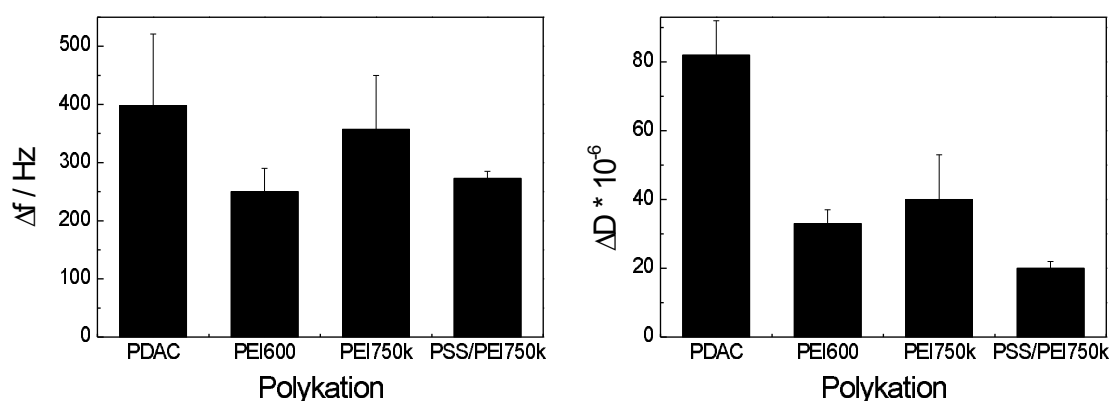


Abb. 4.10: Übersicht über die Frequenz- und Dissipationsänderungen bei Adsorption von bR-haltigen Vesikeln an die verwendeten Polykationen.

4.2.3 Adsorption von Purpurmembranen an *painted membranes*

Die dritte Strategie der Immobilisierung von Bacteriorhodopsin bestand - bei den porösen Substraten - in der Adsorption an nano-BLMs. Um diese Art von Membran auf der Quarzelektrode zu simulieren, wurden *painted membranes* verwendet. Sie enthielten zu 2,5 % das positiv geladene Detergenz Octadecylamin (ODA), um Adsorption über elektrostatische Wechselwirkungen zu begünstigen.

Charakterisierung der Membran mittels Impedanzspektroskopie Vor der Zugabe von PM-Fragmenten zur Membran wurden Impedanzspektren aufgenommen, um die Qualität der Membranpräparation zu kontrollieren. Da in keinem Fall im beobachteten Frequenzfenster ein Membranwiderstand detektiert werden konnte, wurde das Ersatzschaltbild in Abb. 3.4 B verwendet. Darauf basierend wurde aus den Spektren durch nichtlineare Kurvenanpassung an die Meßdaten der Wert der Membrankapazität C_m extrahiert. Bei der Präparation von *painted membranes* aus zwei Monoschichten wurde nach jeder Schicht ein Impedanzspektrum aufgenommen. Die erste Monoschicht wurde durch Chemisorption von Oktadekanthiol (ODT) oder Dipalmitoylphosphatidylthioethanol (DPSTE) aufgebaut, die zweite in einem *self-assembly*-Prozeß durch Aufstreichen einer Lösung von Diphytanoylphosphatidylcholin (DPhPC) und Oktadecylamin (ODA) in n-Dekan. Abb. 4.11 zeigt beispielhaft Spektren einer ODA-Monoschicht (\circ) und der Doppelschicht (\square). Bei hohen Frequenzen ist der Elektrolytwiderstand abzulesen, während bei Frequenzen $< 10^4$ Hz das Impedanzverhalten durch die Kapazität der Mono- bzw. Doppelschicht dominiert wird. Nichtlineare Kurvenanpassung der Daten an die Parameter des Ersatzschaltbildes in Abb. 3.4 B lieferte folgende Werte für die Monoschichten:

- ODT: $C = (1,2 \pm 0,2) \mu\text{F}/\text{cm}^2$
- DPSTE: $C = (1,8 \pm 0,7) \mu\text{F}/\text{cm}^2$

und für die Doppelschichten:

- ODT/DPhPC: $C = (0,43 \pm 0,05) \mu\text{F}/\text{cm}^2$
- DPSTE/DPhPC: $C = (0,9 \pm 0,3) \mu\text{F}/\text{cm}^2$

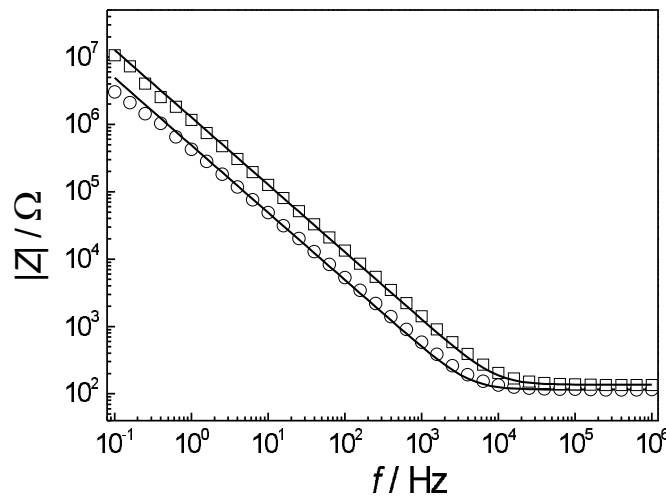


Abb. 4.11: Impedanzspektrum einer mit ODT funktionalisierten, planaren Goldelektrode vor (○) und nach (□) der Ausbildung einer *painted membrane*. Die durchgezogene Linien sind das Ergebnis einer Kurvenanpassung auf der Basis des in Abb. 3.4 B gezeigten Ersatzschaltbildes. Fitparameter: $C_{ODT}=1,1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $C_{ODT/DPbPC}=0,4 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $R_e=140 \Omega$

Adsorptionsverhalten Abb. 4.12 zeigt den Adsorptionsprozeß von Purpurmbranenfragmenten an diese Oberfläche. Es ist sowohl die Frequenzänderung als auch die Dissipationsänderung gegen die Zeit aufgetragen. Es wurde eine maximale Frequenzänderung von 45 Hz und eine Dissipationsänderung von $10 \cdot 10^{-6}$ ermittelt. Nach weiteren Zugaben konnte keine Frequenz- oder Dissipationsänderung mehr beobachtet werden.

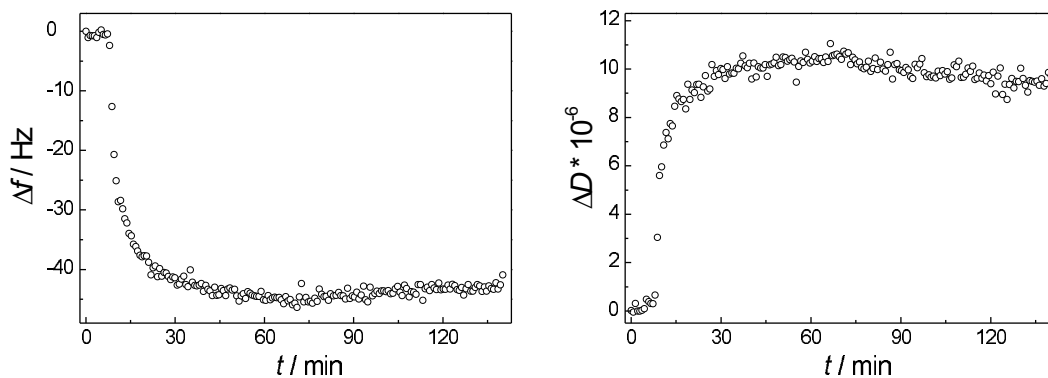


Abb. 4.12: Frequenz- und Dissipationsänderungen bei Adsorption von Purpurmbranen an *painted membranes*. Die Messungen wurden in 10 mM Tris/HCl, 100 mM KCl, pH 7,4 durchgeführt. Es wurden PM-Fragmente mit einer Endkonzentration von $5 \cdot 10^{-3} \text{ mg/ml}$ zugegeben.

4.3 Messung der Aktivität lichtaktivierter Proteine

Die Untersuchung des Adsorptionsverhaltens von PM-Fragmenten bzw. bR-haltigen Vesikeln mit Hilfe der Quarzmikrowaagetechnik hat gezeigt, daß bei allen Strategien zur Funktionalisierung der Oberfläche Bacteriorhodopsin auf den Goldelektroden immobilisiert wurde. Im folgenden wurde die Aktivität des Proteins auf diesen Substraten untersucht.

4.3.1 Bacteriorhodopsin in Purpurmembranen

Zur Untersuchung der Aktivität von Bacteriorhodopsin in Purpurmembranen auf der Oberfläche von modifizierten Goldelektroden und porösen Aluminaten wurde die lichtinduzierte Protonenpumpaktivität genutzt. Die Belichtung des Proteins führt zu einem Protonenstrom, der mit Hilfe der in Kap. 3.3 beschriebenen Strommeßapparatur aufgezeichnet wurde. Vor der Immobilisierung des Bacteriorhodopsins wurde jeweils die Stromantwort des verwendeten Festkörpersubstrats bei Belichtung gemessen. Die dabei auftretenden Ströme werden als Photoartefakte bezeichnet. Sie sind stark von der Natur des Festkörpers und dessen Vorbehandlung abhängig. Mögliche Ursachen für das Auftreten von Photoartefakten sind Absorption von Photonen in der Metalloberfläche und dadurch induzierte Ladungstrennung und -verschiebung innerhalb des Festkörpers. Da die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Artefakte sich in Abhängigkeit vom verwendeten Substrat in Form und Größe stark unterscheiden, werden sie im folgenden jeweils zusammen mit den entsprechenden Bacteriorhodopsin-Strömen vorgestellt. Die Aktivität des Proteins in Abhängigkeit von der jeweiligen Oberflächenmodifikation wurde sowohl auf planaren Goldelektroden als auch auf porösen Aluminaten untersucht. Im folgenden werden zunächst die Ergebnisse der Präparationen auf den Goldelektroden geschildert.

4.3.1.1 Aktivität auf planaren Goldoberflächen

Aktivität auf geladenen Thiofschichten

Die Aktivität von Bacteriorhodopsin, immobilisiert auf geladenen Thiolmonoschichten wurde schon von Steinem^[91] untersucht. Die Methode ist sehr einfach und zuverlässig und wurde daher im Rahmen dieser Arbeit auch zur standardmäßigen Kontrolle der Aktivität des Proteins genutzt. Abb. 4.13 zeigt das Ergebnis der Belichtung dieses Systems und den entsprechenden Photoartefakt bei Belichtung der Mercaptoethylamin (MEA)-beschichteten Goldelektrode vor der Adsorption von Purpurmembranfragmenten. Ein positiver Strom entspricht einem Fluß

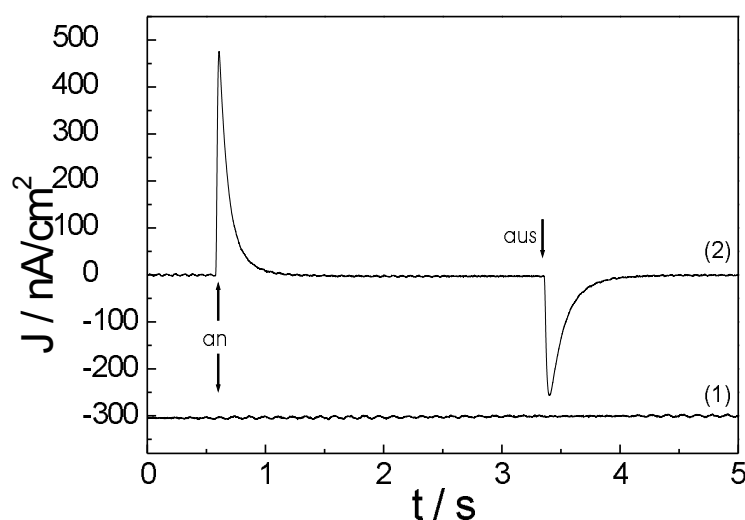


Abb. 4.13: Stromantwort einer mit Mercaptoethylamin beschichteten Goldelektrode vor (1) und nach (2) der Immobilisierung von Purpurmembranfragmenten. Die Immobilisierung erfolgte durch Inkubation mit beschallten PM-Fragmenten (0,1 mg/ml). Die Messung wurde in 10 mM BisTris/HCl, pH 5,6 durchgeführt. Der Photoartefakt ist zur besseren Übersichtlichkeit um -300 nA/cm^2 verschoben.

von positiven Ladungen zur Goldelektrode. Die Stromantwort ist durch zwei transiente Ströme gekennzeichnet, die beim Ein- bzw. Ausschalten des Lichts auftreten. Der erste Strompeak kann auf die Pumpaktivität des Proteins zurückgeführt werden, der zweite ist das Ergebnis von passiven Ladungsverschiebungen. Die gemessenen Maximalstromdichten beim Einschalten lagen bei $(370 \pm 130) \text{ nA/cm}^2$. Photoartefakte traten bei diesem System wie im gezeigten Beispiel gar nicht oder in Form eines Rechteckstroms von wenigen Nanoampere Größe auf. Bei Beschich-

tung mit Mercaptoundecylamin (MUA) wurden ebenfalls zwei transiente Ströme beobachtet. Die Maximalstromdichten betragen hier $(60 \pm 30) \text{ nA/cm}^2$.

Aktivität auf Polyelektrolytschichten

Wie in Kap. 4.2.2 geschildert wurde Bacteriorhodopsin zur Immobilisierung auf Polyelektrolyt-Schichten in Vesikel rekonstituiert. Die Aktivitätsmessungen zu diesem System wurden bereits in einer früheren Arbeit durchgeführt^[98]. Abb. 4.14 zeigt beispielhaft die Stromantwort von Bacteriorhodopsin-haltigen Vesikeln adsorbiert auf einer PDAC-Schicht. Es wurden zwei transiente Ströme beim Ein- und Ausschalten des Lichts beobachtet. Es traten bei der Belichtung der beschichteten Goldelektrode nur geringe Photoartefakte auf, die eindeutig von dem Bacteriorhodopsin-Signal unterschieden werden konnten. Die Aktivität des Pro-

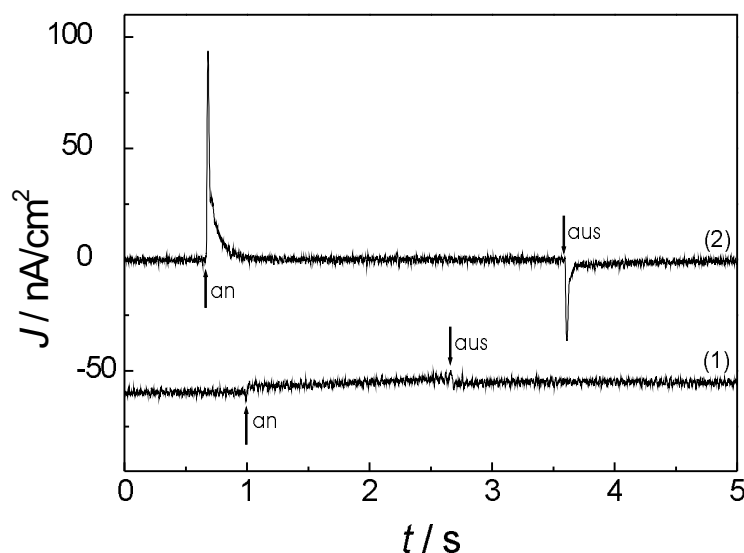


Abb. 4.14: Stromantwort von bR-haltigen Asolectin/DPPA-Vesikeln (10 mol% DPPA, Lipid/Protein=1/100), adsorbiert an eine PDAC-Schicht (1) und vom Polykation allein (2), gemessen in 10 mM BisTris/HCl, pH 5,6. Die Stromantwort ohne bR ist aus Gründen der Übersichtlichkeit um -60 nA/cm^2 verschoben.

teins wurde ferner durch Verringerung des Lipid-Protein-Verhältnisses und der einhergehenden Abnahme der Maximalstromdichte nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Die Maximalstromdichten in Abhängigkeit vom verwendeten Polykation sind in Abb. 4.15 aufgeführt. Es zeigte sich, daß die besten Resultate bei Verwendung hochmolekularer Polykationen erzielt wurden.

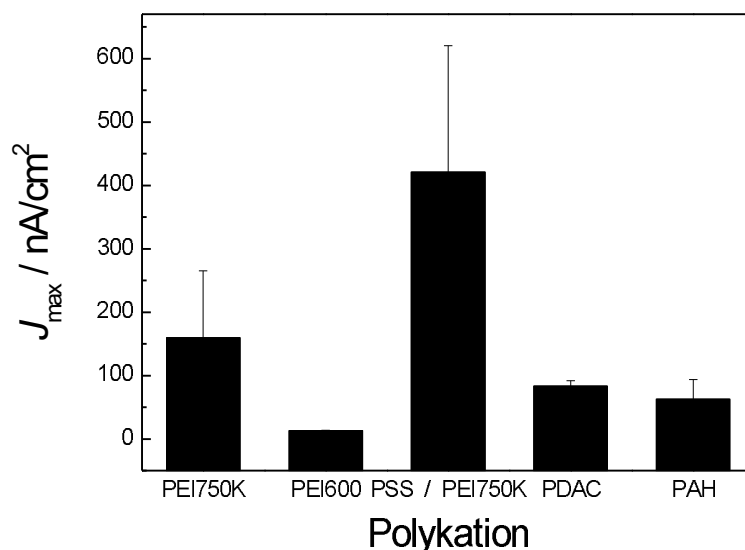


Abb. 4.15: Zusammenfassende Darstellung der maximalen Stromdichten bei Adsorption bR-haltiger Vesikel an unterschiedliche Polykationen bzw. im Fall von PEI 750K einer zusätzlichen Polyanion-Schicht.

Aktivität auf *painted membranes*

Die Aktivität von Bacteriorhodopsin in Purpurmembranen, adsorbiert an *painted membranes* wurde wieder durch Messung der lichtinduzierten Protonenpumpaktivität überprüft. In Abb. 4.16 sind die transienten Ströme nach Belichtung des Systems gezeigt. Außerdem ist die Stromantwort der Lipidmembran vor der Adsorption der Purpurmembranfragmente dargestellt. Im gezeigten Beispiel wurden Maximalstromdichten beim Einschalten von 265 nA/cm^2 erreicht. Der Stromfluß fiel anschließend nicht ganz auf $J = 0$ ab, sondern verblieb bis zum Ausschalten des Lichts auf einem Niveau von ca. 1 nA/cm^2 . Der dargestellte Kurvenverlauf ist charakteristisch für alle Präparationen, die gemessenen Maximalstromdichten variierten jedoch in einem großen Bereich zwischen $15\text{-}270 \text{ nA/cm}^2$, was durch die Menge und Orientierung der adsorbierten Membranfragmente erklärt werden kann. Wie schon bei den im vorigen Kapitel beschriebenen Messungen wurde hier kein Photoartefakt beobachtet. Da letzterer jedoch unregelmäßig und unreproduzierbar auftrat, ist der kleine stationäre Strom während der Belichtung möglicherweise auf Photoartefakte zurückzuführen.

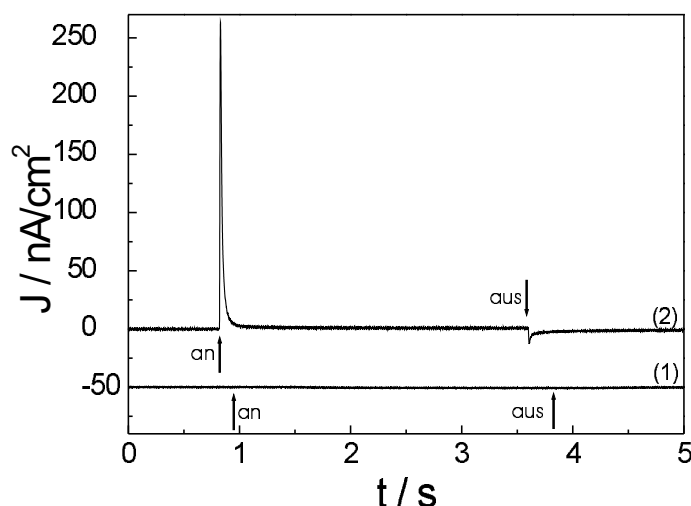


Abb. 4.16: Stromantwort einer mit einer *painted membrane* beschichteten Goldelektrode vor (1) und nach (2) der Immobilisierung von Purpurmembranfragmenten. Die Immobilisierung erfolgte durch Inkubation mit beschallten PM-Fragmenten (0,1 mg/ml). Die Messung wurde in 10 mM Tris/HCl, 100 mM KCl, pH 7,4 durchgeführt. Der Photoartefakt ist zur besseren Übersichtlichkeit um -50 nA/cm^2 verschoben.

Im folgenden wurde die Maximalstromdichte beim Einschalten des Lichts als charakteristische Größe für den Pumpstrom des Bacteriorhodopsins gewählt. Abb. 4.17 A zeigt beispielhaft den zeitlichen Verlauf der Maximalstromdichten nach Zugabe der PM-Fragmente zum Zeitpunkt $t = 0$. Der kontinuierliche Anstieg der Maximalstromdichte verdeutlicht die zunehmende Immobilisierung von Bacteriorhodopsin auf der Oberfläche. Nach ca. 50 min war dieser Prozeß abgeschlossen und die Stromdichte erreichte ihren maximalen Wert.

Aktionsspektrum Zur weiteren Charakterisierung des lichtinduzierten Protonenstroms wurde ein Aktionsspektrum aufgenommen. Abb. 4.17 B zeigt die normierten Maximalstromdichten beim Einschalten des Lichts in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Die gestrichelte Linie stellt einen Gauss-Fit an die Daten dar. Zum Vergleich ist das normierte Absorptionsspektrum einer PM-Suspension mit dem charakteristischen Absorptionsmaximum von Bacteriorhodopsin bei $\lambda_{max} = 568 \text{ nm}$ gezeigt. Das Aktionsspektrum von an *painted membranes* adsorbierten Purpurmembranen ist im Vergleich dazu um ca. 20 nm rotverschoben.

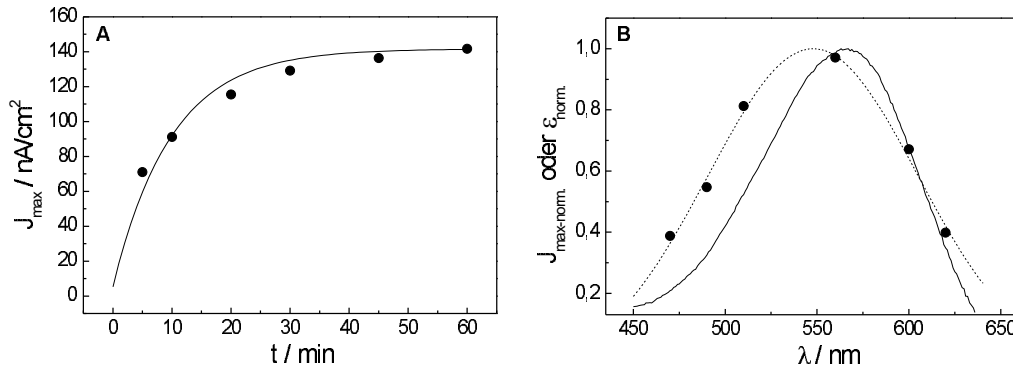


Abb. 4.17: **A** Zeitlicher Verlauf der Maximalstromdichten beim Einschalten des Lichts nach Zugabe der PM-Fragmente. Die durchgezogene Linie soll lediglich den Kurvenverlauf verdeutlichen. **B** Aktionsspektrum von Bacteriorhodopsin, immobilisiert auf *painted membranes*. Die wellenlängenabhängigen Maximalstromdichten wurden durch Verwendung von Interferenz-Bandfiltern erhalten und um das Lampenspektrum korrigiert. Die gestrichelte Linie stellt einen Gauss-Fit an die Daten dar, die durchgezogene Linie ist das Absorptionsspektrum einer PM-Suspension.

Theoretische Beschreibung der lichtinduzierten Protonenströme Die theoretische Beschreibung der lichtinduzierten Protonenströme basiert auf dem Ersatzschaltbild in Abb. 4.18. R_p und C_p repräsentieren den Widerstand und die Kapazität der PM-Schicht, aktives Bacteriorhodopsin wird als Stromquelle $I_p(t)$ dargestellt. In der impedanzspektroskopischen Charakterisierung der *painted membranes* (Kap. 4.2.3) zeigte sich, daß der Membranwiderstand so groß war, daß er im beobachteten Frequenzfenster nicht detektiert werden konnte. Da daher von einer sehr geringen Protonenleitfähigkeit ausgegangen werden kann, vereinfacht sich die Beschreibung der Lipidmembran in diesem Fall zu dem bereits in Abb. 3.4 gezeigten Ersatzschaltbild mit C_{m+el} als Summe aus Membran- und Grenzschichtkapazität. Der Widerstand des Elektrolyten R_e wird zur Vereinfachung der Knotenanalyse des Netzwerks vernachlässigt. Durch Absorption von Licht erzeugt Bacteriorhodopsin einen Pumpstrom I_p , der eine Spannung V_p über der Purpurmembran aufbaut. Unter der Kurzschlußbedingung, daß über den beiden Lipidmembranen die gleiche Spannung abfällt ($V_p = V_m$), gilt nach Herrmann und Rayfield^[40] ein linearer Zusammenhang zwischen I_p und V_p :

$$I_p = I_{p0} \left(1 - \frac{V_p}{V_*} \right) \quad (4.6)$$

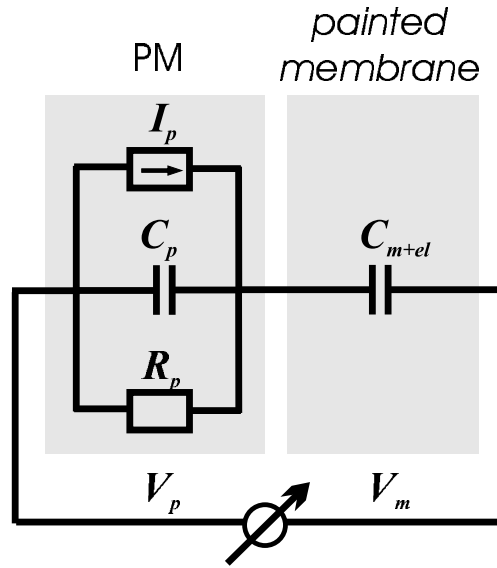


Abb. 4.18: Ersatzschaltbild zur Beschreibung der an *painted membranes* adsorbierten PM-Fragmente. I_p bezeichnet den Protonenstrom, der durch Belichtung des Bacteriorhodopsins erzeugt wird. Der Pfeil gibt die positive Stromrichtung an. R_p und C_p repräsentieren den Widerstand und die Kapazität der PM-Schicht. Die Kapazitäten der *painted membrane* und der Goldelektrode wurden zu C_{el+m} zusammengefaßt. V_p und V_m bezeichnen den Spannungsabfall über den entsprechenden Elementen.

I_{p0} bezeichnet den Pumpstrom bei $V_p = 0$, V^* ist eine Konstante. Die Knotenanalyse des Ersatzschaltbildes in Abb. 4.18 liefert folgende Differentialgleichung:

$$(C_p + C_{m+el})\dot{V}_p + (G_p + \frac{I_{p0}}{V^*})V_p = I_{p0} \quad (4.7)$$

Für den Strom nach dem Einschalten des Lichts liefert die Lösung der Differentialgleichung 4.7 folgendes Ergebnis:

$$I(t) = I_{max,an} \exp\left(-\frac{t}{\tau_{an}}\right) \quad (4.8)$$

mit der Abkürzung

$$I_{max,an} = I_{p0} \frac{C_{m+el}}{C_p + C_{m+el}} \quad (4.9)$$

und der Zeitkonstanten

$$\tau_{an} = \frac{C_p + C_{m+el}}{G_p + \frac{I_{p0}}{V^*}} \quad (4.10)$$

Der Pumpstrom I_{p0} und damit auch I_{max} , I_{stat} und τ_{an} hängen nach Bamberg^[39] wie folgt von der Lichtintensität L ab:

$$I_{p0} = I_{p0}^s \frac{L}{L + L_{\frac{1}{2}}} \quad (4.11)$$

wobei I_{p0}^s der Sättigungsstrom von I_{p0} für $L \rightarrow \infty$ und $L_{\frac{1}{2}}$ eine Konstante ist, die dem halbmaximalen Sättigungsstrom entspricht.

Der Zeitverlauf des Stroms nach dem Ausschalten des Lichts ergibt sich analog zu:

$$I(t) = -I_{max,aus} \exp\left(-\frac{t'}{\tau_{aus}}\right) \quad (4.12)$$

mit dem Maximalstrom $I_{max,aus}$ beim Ausschalten der Lichtquelle

$$I_{max,aus} = \frac{V_{max} G_p C_{m+el}}{C_p + C_{m+el}} \quad (4.13)$$

und der Zeitkonstanten

$$\tau_{aus} = \frac{C_p + C_{m+el}}{G_p} \quad (4.14)$$

Die Spannung

$$V_{max} = \frac{I_{p0}}{G_p + \frac{I_{p0}}{V^*}} \quad (4.15)$$

ist die über der Membran aufgebaute Potentialdifferenz bei $t = t_{aus}$. Im Gegensatz zur Zeitkonstante τ_{an} beim Einschalten des Lichts ist die Zeitkonstanten τ_{aus} beim Ausschalten unabhängig von der Lichtintensität.

Variation der Lichtintensität Um die Abhängigkeit der Maximalstromdichten sowie der Zeitkonstanten von der Lichtintensität zu untersuchen, wurden an *painted membranes* adsorbierte Purpurmembranen unter Verwendung unterschiedlicher Blendeneinstellungen an der Halogenlampe belichtet. Abb. 4.19 A zeigt die mit der Lichtintensität zunehmenden Maximalstromdichten beim Ein- bzw. Ausschalten der Lichtquelle. Während der Einschaltstrom stark von der Lichtintensität abhängt, nimmt der Ausschaltstrom nur geringfügig zu. Da bei der höchsten Lampeneinstellung noch keine Sättigung des Protonenstroms zu beobachten war, ist anzunehmen, daß bei Verwendung einer lichtintensiveren Lampe noch größere Maximalstromdichten zu erzielen sind. In Abb. 4.19 B sind die reziproken Zeitkonstanten des Ein- und Ausschaltvorganges gegen die relative Lichtintensität aufgetragen. Wie im vorigen Kapitel beschrieben (Gl. 4.10, 4.14), hängt τ_{an} , nicht aber τ_{aus} von der Intensität des eingestrahlten Lichts ab.

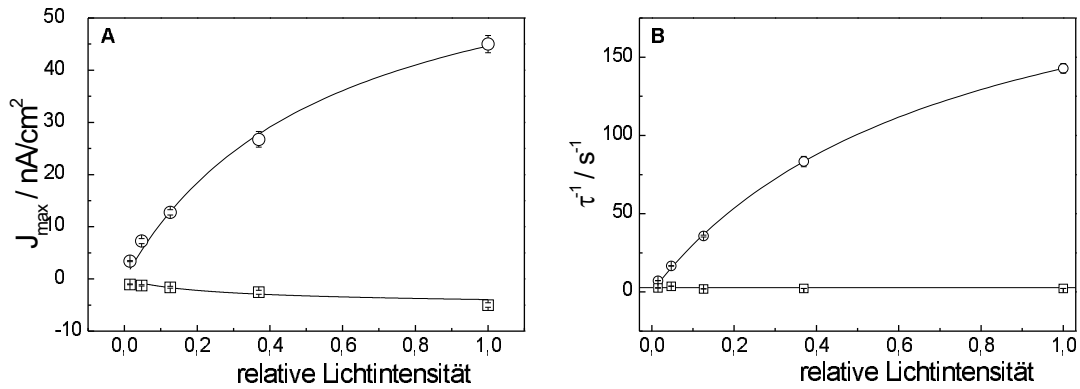


Abb. 4.19: PM adsorbiert an *painted membranes* **A** Abhängigkeit der Maximalstromdichten von der Lichtintensität, (○): $J_{max,an}$, (□): $J_{max,aus}$. Die durchgezogenen Linien sind das Ergebnis einer Kurvenanpassung mit den Gl. 4.9 und 4.13. **B** Abhängigkeit der Zeitkonstanten von der Lichtintensität, (○): τ_{an} , (□): τ_{aus} . Die durchgezogene Linie ist das Ergebnis einer Kurvenanpassung mit Gl. 4.10, τ_{aus} ist unabhängig von der Lichtintensität; Fitparameter: $C_m=1000 \text{ nF/cm}^2$, $C_p=2000 \text{ nF/cm}^2$, $G_p=1 \mu\text{S/cm}^2$, $J_{p0}^s=(530 \pm 180) \text{ nA/cm}^2$, $L_{\frac{1}{2}}=(0,7 \pm 0,1)$, $V^*=(0,001 \pm 0,0005) \text{ V}$.

Einfluß des membranlöslichen Protonencarriers CCCP Ein Nachteil festkörperunterstützter Lipiddoppelschichten ist das Fehlen eines zweiten wässrigen Kompartiments. Zum einen behindert dies den Einbau großer Transmembran-

proteine, zum anderen ist – zumindest bei Verwendung polarisierbarer Elektroden, wie z. B. der hier verwendeten Goldelektrode – die Messung stationärer Ströme wegen der Aufladung der Elektrodenkapazität nicht möglich. Dies sollte auch für den Fall gelten, daß der Membranwiderstand durch Zugabe von Ionophoren gesenkt wird. Bestätigt wird dies durch die in Abb. 4.20 gezeigte

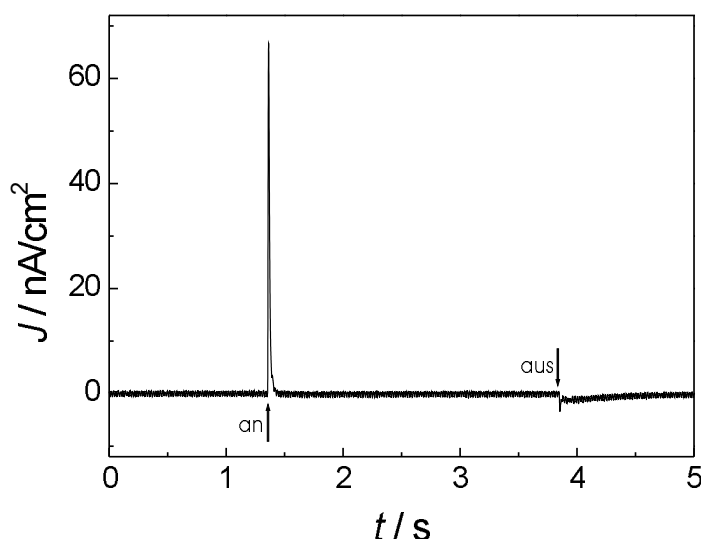


Abb. 4.20: Stromantwort einer mit einer *painted membrane* beschichteten Goldelektrode nach der Immobilisierung von Purpurmembranfragmenten und der Zugabe von 20 μ M CCCP. Die Messung wurde in 10 mM Tris, 100 mM KCl, pH 7,4 durchgeführt.

Stromantwort, die nach der Adsorption von PM-Fragmenten und der Zugabe von 20 μ M Carbonylcyanid-m-chloro-phenylhydrazon (CCCP), einem membranlöslichen Protonencarrier, aufgezeichnet wurde. Wie erwartet konnte kein stationärer Strom beobachtet werden. Bei manchen Experimenten wurde nach der Zugabe von CCCP eine Zunahme der Maximalstromdichte beim Ausschalten des Lichts registriert, bei anderen fiel der Strom nach dem Einschalten des Lichts nicht ganz auf $I = 0$ ab. Letzteres ist möglicherweise auf Photoartefakte zurückzuführen.

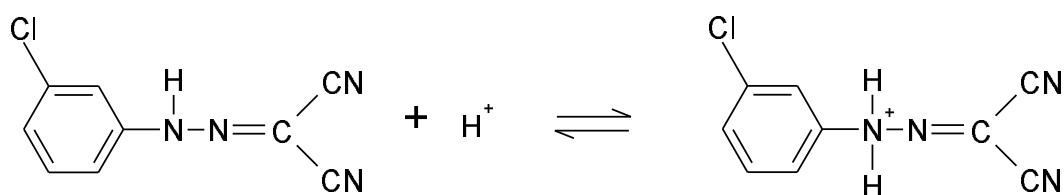


Abb. 4.21: Struktur und Funktion des membranlöslichen Protonencarriers CCCP.

4.3.1.2 Aktivität auf porösem Aluminat

Bei der Immobilisierung von Bacteriorhodopsin auf Goldelektroden wurden drei Strategien zur Oberflächenmodifikation angewandt. Bei allen Varianten wurden Photoströme gemessen, die auf die Aktivität von Bacteriorhodopsin an der Oberfläche zurückzuführen sind. Daher wurde anschließend die Eignung aller drei Strategien zur Immobilisierung des Proteins auf porösen Substraten untersucht. Die Stege zwischen den Poren des Substrats wurden dazu mit einer 30-100 nm dicken Goldschicht besputtert, um Chemisorption von Thiolen zu ermöglichen. Bei der Funktionalisierung mit Aminoalkanthiolen und Polyelektrolytschichten wurden Aluminate mit unten geschlossenen Poren verwendet, wie es in Abb. 4.22 A gezeigt ist. Die elektrische Kontaktierung erfolgte in diesem Fall über das sich unter dem Barriereoxid befindende Aluminium. Nach Entfernung des Aluminiums und des Barriereoxids (Kap. 3.5.1) liegt ein Substrat mit durchgehenden Poren vor (Abb. 4.22 C). Dieses wurde bei der Oberflächenfunktionalisierung mit nano-BLMs verwendet.

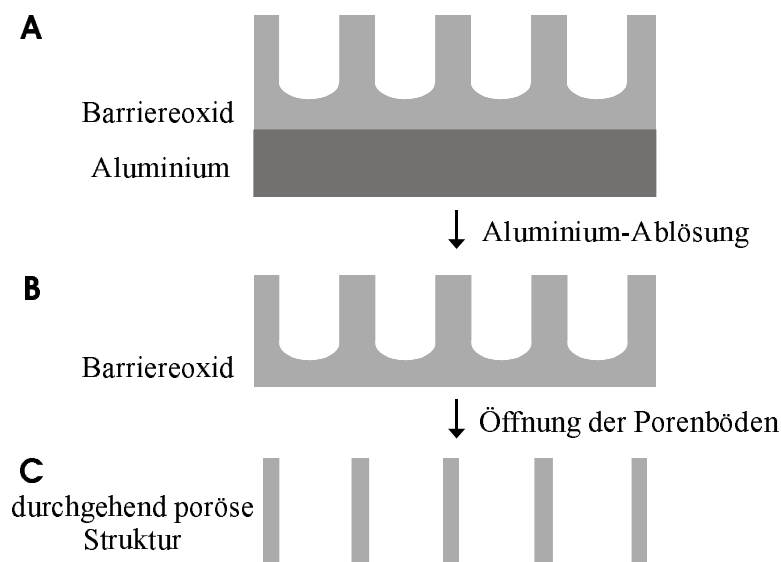


Abb. 4.22: Schematische Darstellung von porösen Aluminaten mit geschlossenen Poren (A) und der durch Ablösen des Aluminiums und des Barriereoxids entstehenden siebartigen Struktur mit durchgehenden Poren (C).

Aktivität bei Oberflächenmodifikation mit MEA

Abb. 4.23 A zeigt die Stromantwort eines Aluminats mit geordneten Poren, das mit Mercaptoethylamin (MEA) beschichtet wurde, vor (1) und nach (2) der Zugabe von PM-Fragmenten zum Meßpuffer. Beide Stromantworten sind gekennzeichnet durch einen schnellen Anstieg der Stromdichte beim Einschalten des Lichts und einen darauf folgenden langsamen Abfall, bis der Strom beim Ausschalten des Lichtes schnell wieder auf null abfällt. Zwei Beobachtungen deuten darauf hin, daß in beiden Fällen der Photoartefakt des Aluminium-Substrats gemessen wurde oder zumindest der Protein-induzierte Strom dadurch überlagert wird: Erstens stimmen die beiden Signale in der Kurvenform überein, zweitens ist die maximale Stromdichte vor der Zugabe von PM-Fragmenten ($J_{max} = 115 \text{ nA/cm}^2$) sogar größer als nachher ($J_{max} 100 \text{ nA/cm}^2$). Es wurden jeweils sechs direkt aufeinander folgende Belichtungen durchgeführt. Während Abb. 4.23 A das Ergebnis der jeweils ersten Belichtung zeigt, ist in Teil B die jeweils sechste Messung gezeigt. Die Photoartefakte sind dort deutlich reduziert, stimmen aber immer noch in Form und Ausmaß mit der Stromantwort nach Zugabe von PM-Fragmenten überein, so daß nicht eindeutig auf die Aktivität des Proteins geschlossen werden kann.

Im folgenden wurde untersucht, ob durch Veränderung der Porenstruktur evtl.

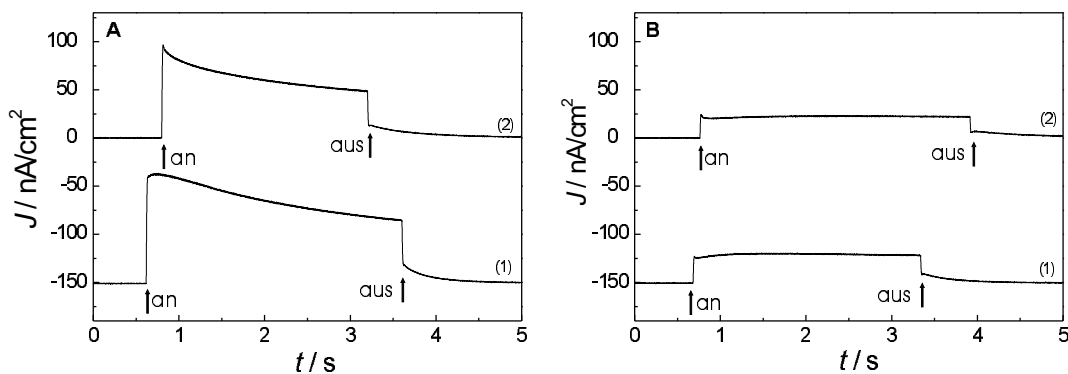


Abb. 4.23: Stromantwort eines mit Mercaptoethylamin beschichteten porösen Aluminats mit geordneten Poren vor (1) und nach (2) der Immobilisierung von Purpurmbranfragmenten. Die Immobilisierung erfolgte durch Inkubation mit beschallten PM-Fragmenten (0,1 mg/ml). Die Messung wurde in 10 mM BisTris, pH 5,6 durchgeführt. Der Photoartefakt ist zur besseren Übersichtlichkeit um -150 nA/cm^2 verschoben. **A** jeweils erste von sechs direkt aufeinander folgenden Messungen, **B** jeweils sechste Messung.

der Photoartefakt reduziert werden kann, um eine Unterscheidung zum bR-induzierten Photostrom zu ermöglichen. Eine Übersicht mit rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen der verwendeten Substrate mit unterschiedlichen Porengrößen ist in Abb. 4.24 dargestellt. Teil A zeigt einen Ausschnitt von porösem Aluminat mit geordneten Poren, die in einem zweistufigen Ätzprozeß mit Oxalsäure erhalten werden. Die Poren sind als dunkle Kreise zu erkennen und haben einen Durchmesser von (31 ± 9) nm bei einer Porösität von (36 ± 7) %. Daneben ist unter B ein Ausschnitt eines Substrats mit ungeordneten Poren zu sehen, die durch einen einstufigen Ätzprozeß mit Oxalsäure erhalten werden. Sie haben Porendurchmesser von (22 ± 6) nm und eine Porösität von (17 ± 3) %. In Abb. 4.24 C sind Poren zu sehen, die durch Ätzung mit Phosphorsäure entstanden sind. Die Porendurchmesser betragen (150 ± 25) nm bei einer Porösität von (18 ± 3) %. Diese Substrate wurden auch bei der Präparation von nano-BLMs (s. u.) verwendet. Dazu wurde vorher das Barriereoxid unter den Poren entfernt. Da dies nicht selektiv geschah, wurden die Poren dabei aufgeweitet. Es resultierten Porendurchmesser von (280 ± 45) nm bei einer Porösität von (33 ± 4) %.

Abb. 4.25 zeigt das Ergebnis der Strommessungen bei Verwendung von Aluminaten mit ungeordneter Porenstruktur. Als Aminoalkanthiol diente wieder MEA. Erneut sind die Stromantworten der jeweils ersten bzw. sechsten aufeinander folgenden Belichtung in den Abbildungsteilen A und B dargestellt. Die Photoartefakte sind im Vergleich zu den geordneten Poren deutlich reduziert. Jedoch können die Stromantworten ohne und mit Bacteriorhodopsin nicht voneinander unterschieden werden. Beide sind gekennzeichnet durch transiente Ströme beim Ein- und Ausschalten des Lichts. Eine weitere Reduzierung des Photoartefaktes nach mehrfacher Belichtung konnte nicht festgestellt werden.

Als dritte und letzte Variation bei der Wahl des porösen Substrats wurden Phosphorsäure-geätzte Aluminate verwendet, die wesentlich größere Poren aufweisen (Abb. 4.24). Es zeigte sich erneut, daß die Stromantworten vor (1) und nach (2) Zugabe der PM-Fragmente nicht differenziert werden können. Sie sind gekenn-

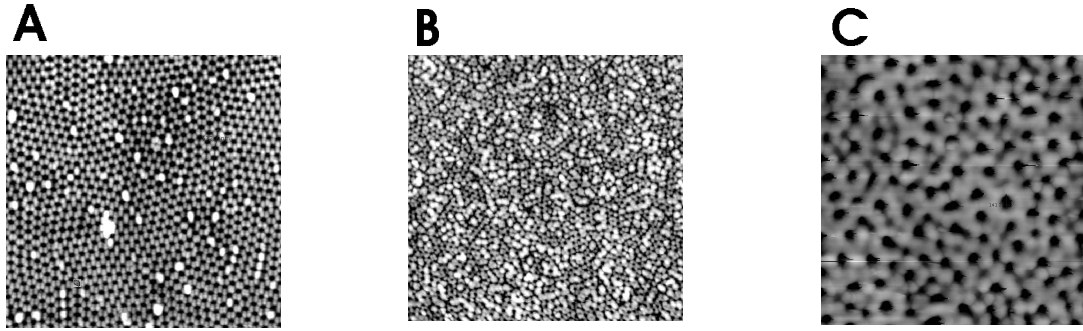


Abb. 4.24: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von porösen Aluminaten: **A** geordnete Porenstruktur: Porendurchmesser (31 ± 9) nm, Porösität (36 ± 7) %. **B** ungeordnete Porenstruktur: Porendurchmesser (22 ± 6) nm, Porösität (17 ± 3) %. **C** durch Phosphorsäure-Ätzung erhaltene Porenstruktur: Porendurchmesser (150 ± 25) nm, Porösität (18 ± 3) %. Nach der Entfernung des Barriereoxids bei diesen Substraten zur Preparation von nano-BLMs wurden folgende Werte erhalten: Porendurchmesser (280 ± 45) nm, Porösität (33 ± 4) %.^[52, 92]

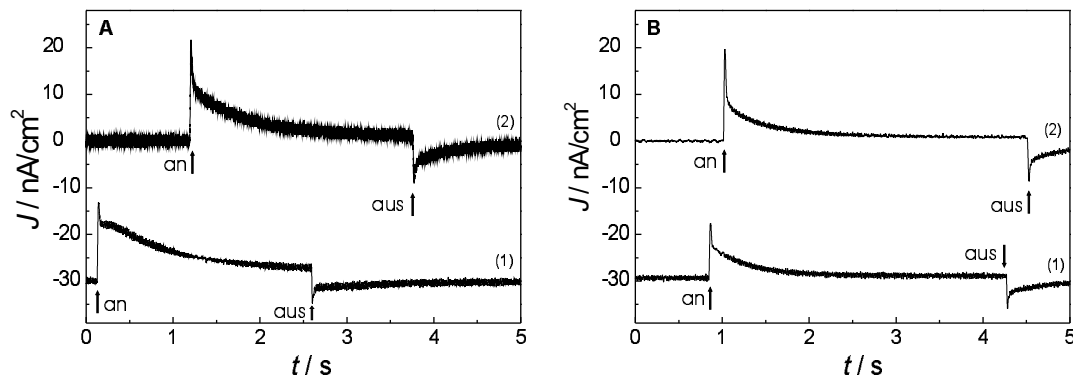


Abb. 4.25: Stromantwort eines mit Mercaptoethylamin beschichteten porösen Aluminats mit ungeordneten Poren vor (1) und nach (2) der Immobilisierung von Purpurmbranfragmenten. Die Immobilisierung erfolgte durch Inkubation mit beschallten PM-Fragmenten (0,1 mg/ml). Die Messung wurde in 10 mM BisTris, pH 5,6 durchgeführt. Der Photoartefakt ist zur besseren Übersichtlichkeit um -30 nA/cm² verschoben. **A** jeweils erste von sechs direkt aufeinander folgenden Messungen, **B** jeweils sechste Messung

zeichnet durch einen transienten Strom beim Einschalten des Lichts, gefolgt von einem Rechteckstrom, der beim Ausschalten des Lichts schnell auf null absinkt. Die erhaltenen Stromdichten wurden durch Mehrfachbelichtung stark reduziert, wobei die transiente Komponente fast völlig verschwindet.

Zusammenfassend läßt sich für den Photoartefakt bei den drei verwendeten Substraten festhalten, daß dieser mit zunehmender Porengröße ebenfalls zunahm und

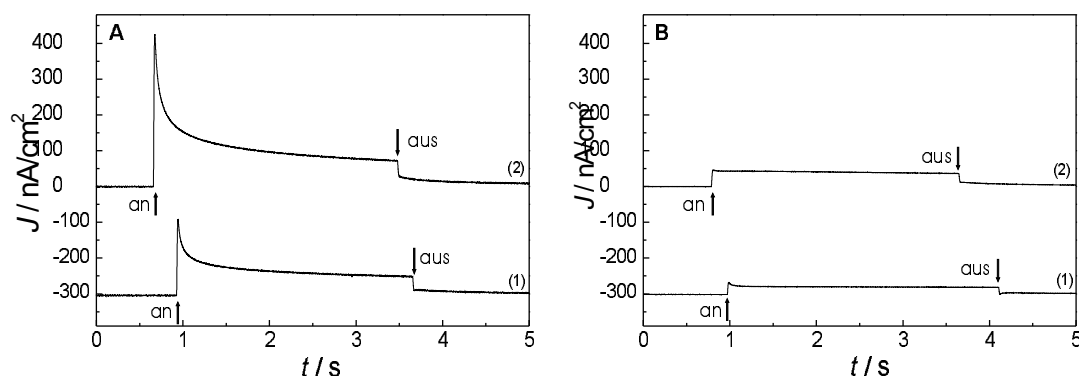


Abb. 4.26: Stromantwort eines mit Mercaptoethylamin beschichteten porösen Aluminats mit Phosphorsäure-geätzten Poren vor (1) und nach (2) der Immobilisierung von Purpurmembranfragmenten. Die Immobilisierung erfolgte durch Inkubation mit beschallten PM-Fragmenten (0,1 mg/ml). Die Messung wurde in 10 mM BisTris, pH 5,6 durchgeführt. Der Photoartefakt ist zur besseren Übersichtlichkeit um -300 nA/cm^2 verschoben. **A** jeweils erste von sechs direkt aufeinander folgenden Messungen, **B** jeweils sechste Messung.

bei keinem Substrat vom Signal nach der Zugabe von PM-Fragmenten unterschieden werden konnte. Die Versuche wurden auch unter Funktionalisierung der Porenstege mit Mercaptoundecylamin (MUA) durchgeführt, wobei erneut Photoartefakte und vermeintliche bR-induzierte Ströme nicht differenziert werden konnten.

Durch Einlegen der porösen Aluminate in Chromsäure (Kap. 3.5.1.2) läßt sich die poröse Struktur entfernen, so daß nur ein Barriereoxid übrig bleibt. Wird dieses Substrat mit Gold besputtert und mit MEA funktionalisiert, sollte die Adsorption von PM-Fragmenten wieder möglich sein und es sollten Stromantworten wie bei der Immobilisierung von Bacteriorhodopsin auf Goldelektroden (Kap. 4.3.1.1) beobachtet werden. Abb. 4.27 zeigt das Ergebnis dieses Experiments, sowie eine schematische Darstellung des Substrats. Die erhaltene Stromantwort ist gekennzeichnet durch zwei transiente Ströme beim Ein- bzw. Ausschalten des Lichts (2) mit einer Maximalstromdichte von $J = 55 \text{ nA/cm}^2$. Der Photoartefakt (1) ist im Vergleich dazu gering, wie es bereits bei der Belichtung der Goldelektroden beobachtet wurde (Kap. 4.3.1.1). Die im Vergleich zur Präparation auf Goldelektroden kleinere Zeitkonstante des Transienten beim Einschalten des Lichts ist vermutlich

auf kleine Defekte in der 100-nm-Goldschicht zurückzuführen, die eine langsamere Aufladung der Goldkapazität bedingen würden.

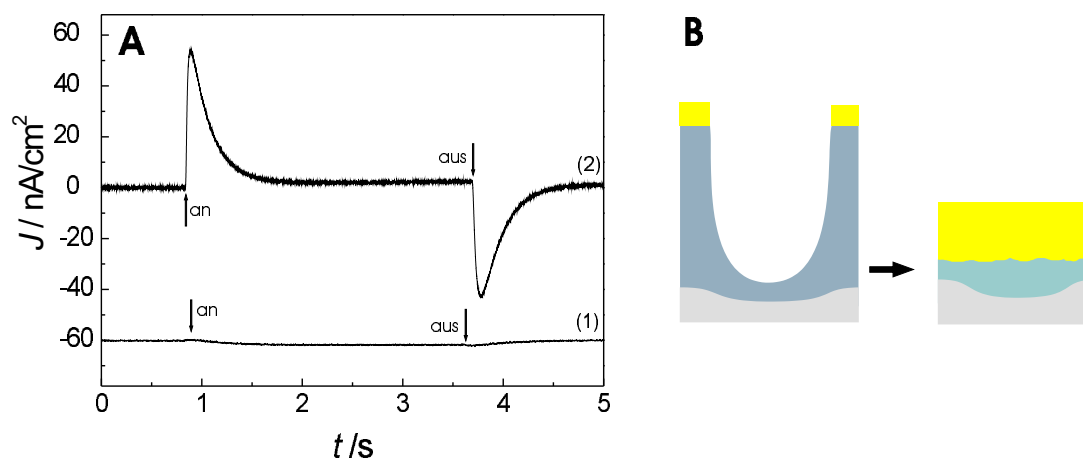


Abb. 4.27: **A** Stromantwort eines Aluminats, bei dem die poröse Struktur abgelöst, und das verbleibende Barriereoxid mit 100 nm Gold besputtert wurde, mit Mercaptoethylamin-Beschichtung (1) und nach (2) der Immobilisierung von Purpurmbranfragmenten. Die Immobilisierung erfolgte durch Inkubation mit beschallten PM-Fragmenten (0,1 mg/ml). Die Messung wurde in 10 mM BisTris, pH 5,6 durchgeführt. Der Photoartefakt ist zur besseren Übersichtlichkeit um -60 nA/cm^2 verschoben. **B** Schematische Darstellung des Aluminats vor und nach Entfernen des porösen Oxidteils und Besputtern mit einer 100 nm-Goldschicht.

Aktivität bei Oberflächenmodifikation mit Polyelektrolyt-Schichten

Um die Aktivität von Bacteriorhodopsin an der Oberfläche nachzuweisen, mußte – wie die Ergebnisse des vorigen Kapitels zeigen – zum einen der Photoartefakt bei Belichtung der Aluminate reduziert und zum anderen die Oberflächenladungsdichte erhöht werden. Beide Ziele sollten durch Überspannen der Poren mit Polyelektrolyt-Multischichten erreicht werden. Die Beschichtung von planaren Goldelektroden mit einer Polykation-Schicht erwies sich, wie in Kap. 4.3.1.1 beschrieben, als geeignet, um Bacteriorhodopsin, rekonstituiert in Vesikel, zu immobilisieren und lichtinduzierte Ströme zu messen. Die Adsorption einer einzelnen Polykation-Schicht würde aber nur zur Beschichtung der Porenstege führen. Eine Erhöhung der Oberflächenladungsdichte kann nur durch Überspannen der Poren mit mehreren Schichten aus alternierenden Lagen aus Polyanionen- und -kationen

gelingen. Drexler und Harris^[92,96] zeigten, daß dazu mindestens 10 Polyelektrolyt-Schichten benötigt werden. Dementsprechend wurden hier die goldbedampften Porenstege zunächst mit MEA funktionalisiert, um dann insgesamt fünf Doppelschichten aus Polystyrolsulfonsäure als Polyanion und PEI 2000, PEI750K oder PDAC als Polykation zu adsorbieren. Als Substrate wurden Aluminate mit ungeordneten Poren verwendet, da bei ihnen die kleinsten Photoartefakte gemessen wurden (Kap. 4.3.1.2).

Abb. 4.28 zeigt beispielhaft die lichtinduzierte Stromantwort einer Präparati-

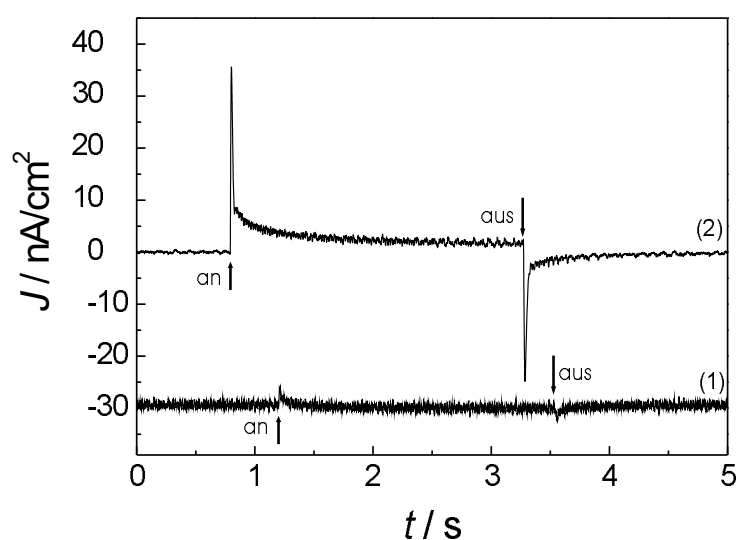


Abb. 4.28: Stromantwort eines mit fünf PSS/PEI 2000-Doppellagen beschichteten Aluminats mit ungeordneten Poren vor (1) und nach (2) der Immobilisierung von bR-haltigen Vesikeln. Die Immobilisierung erfolgte durch Inkubation über Nacht (0,1 mg/ml). Die Messung wurde in 10 mM BisTris, pH 5,6 durchgeführt. Der Photoartefakt ist zur besseren Übersichtlichkeit um -30 nA/cm^2 verschoben.

on mit PEI 2000 als Polykation nach Inkubation des Polyelektrolyt-beschichteten Substrats mit bR-haltigen Vesikeln über Nacht (2). Sie ist gekennzeichnet durch zwei transiente Ströme, wobei der erste beim Einschalten des Lichts eine maximale Stromdichte von $J = 35 \text{ nA/cm}^2$ aufweist. Außerdem ist die Stromantwort vor der Zugabe von Bacteriorhodopsin gezeigt (1). Sie zeichnet sich ebenfalls durch zwei transiente Ströme beim Ein- bzw. Ausschalten des Lichts aus. Die gemessenen Maximalstromdichten sind mit $J = 4 \text{ nA/cm}^2$ allerdings im Vergleich zum Photostrom mit Bacteriorhodopsin deutlich kleiner. Dieser Befund legt nahe, daß der

in Kap. 4.3.1.2 beschriebene Photoartefakt durch die Polyelektrolyt-Beschichtung verringert wird und so die deutliche Erhöhung der Stromdichten nach Inkubation mit bR-Vesikeln auf die Aktivität des Proteins zurückzuführen ist. Jedoch war die Unterscheidung der Signale vor und nach bR-Immobilisierung nicht bei jedem Experiment so eindeutig, wie Abb. 4.29 beispielhaft zeigt. Die Präparation erfolgte parallel zum vorigen Beispiel. Wiederum sind die Stromantworten vor und nach der Inkubation mit bR-haltigen Vesikeln gezeigt, die sich beide durch transiente Ströme beim Ein- und Ausschalten des Lichts auszeichnen. Die maximalen Stromdichten unterscheiden sich in diesem Beispiel nur unmerklich, wenn auch das vermeintliche bR-Signal (2) größer ist. Bei den meisten Präparationen konnten – unabhängig vom verwendeten Polykation – Photoartefakt und vermeintlich bR-induziertes Signal nicht eindeutig differenziert werden.

Die Beschichtung mit Polyelektrolytschichten, die mit dem Ziel der Reduzierung des Photoartefaktes und der Vergrößerung der Oberflächenladungsdichte eingeführt wurde, scheint ebenso wie die Immobilisierung von Bacteriorhodopsin auf Aminoalkanthiolschichten (Kap. 4.3.1.2) nicht geeignet zu sein, die Aktivität des Proteins an der Oberfläche nachzuweisen. Diese Strategie führte weder dazu Photoartefakt und bR-induziertes Signal eindeutig zu differenzieren, noch wurden größere maximale Stromdichten erhalten, die eine weitere Charakterisierung z. B. durch Aufnahme eines Aktionsspektrums oder die Untersuchung der Abhängigkeit von der Lichtintensität ermöglicht hätten. Daher wird im nächsten Kapitel ein weiterer Lösungsansatz für die genannten Probleme beschrieben: die Adsorption von PM-Fragmenten an nano-BLMs unter Verwendung von Aluminaten mit geöffneten Porenböden.

Aktivität bei Oberflächenmodifikation mit nano-BLMs

Bei den in den vorhergehenden Kapiteln beschriebenen Versuchen Bacteriorhodopsin auf porösen Substraten zu immobilisieren, wurden Aluminate mit geschlossenen Poren verwendet. Im Gegensatz dazu wurden zur Präparation von nano-BLMs vorher das Aluminium und das Barriereoxid entfernt, um eine siebartige

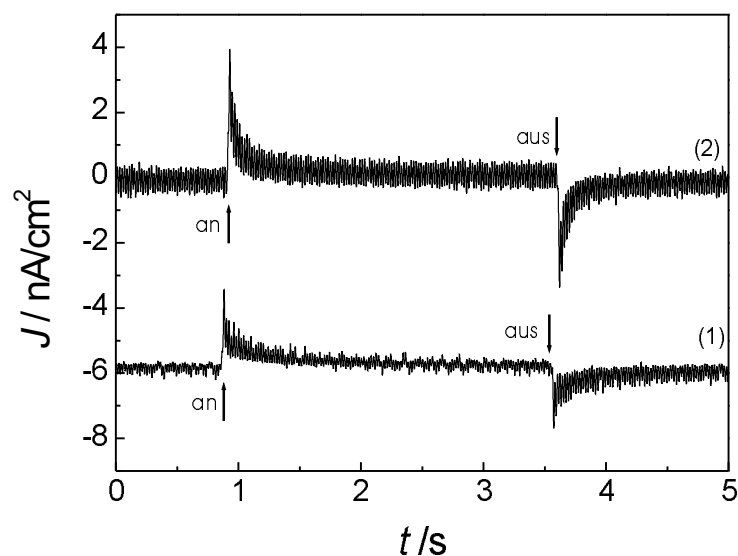


Abb. 4.29: Stromantwort eines mit fünf PSS/PEI 2000-Doppellagen beschichteten Aluminats mit ungeordneten Poren vor (1) und nach (2) der Immobilisierung von bR-haltigen Vesikeln. Die Immobilisierung erfolgte durch Inkubation über Nacht (0,1 mg/ml). Die Messung wurde in 10 mM BisTris, pH 5,6 durchgeführt. Der Photoartefakt ist zur besseren Übersichtlichkeit um -6 nA/cm^2 verschoben.

Struktur zu erhalten. Neben der Tatsache, daß dies die impedanzspektroskopische Charakterisierung der Lipiddoppelschicht erleichtert (s. u.), hatte dies auch Auswirkungen auf den Photoartefakt bei Belichtung des Substrats.

nano-BLMs Analog zur Präparation von *painted membranes* auf planaren Gold-elektroden wurden die nano-BLMs vor der Zugabe von PM-Fragmenten mittels Impedanzspektroskopie charakterisiert. Wie bei den *painted membranes* bestand auch bei der Präparation der nano-BLMs der erste Schritt in der Chemisorption einer Alkanthiol- oder Thiolipid-Schicht, in diesem Fall aber nur auf den goldbe-sputterten Porenstegen. Nach dem *parallel layer*-Modell^[92] leisten die Porenstege keinen Beitrag zum Impedanzspektrum, da der Stromfluß ausschließlich durch die Poren erfolgt. Daher kann auch die Beschichtung der Porenstege nicht impedanzspektroskopisch detektiert werden. Die Kontrolle der erfolgreichen Oberflächenmodifikation erfolgte daher bei den porösen Substraten auf qualitativem Niveau. Durch die Funktionalisierung der Porenstege wurde die Oberfläche sehr hydrophob, was durch Aufbringen eines kleinen Wassertropfens deutlich wurde, wie

Abb. 4.30 B zeigt. Der Tropfen nimmt aufgrund der Hydrophobizität eine nahezu runde Gestalt mit sehr großem Kontaktwinkel zur Oberfläche an. Ohne Funktionalisierung findet Benetzung der Oberfläche statt (Abb. 4.30 A).

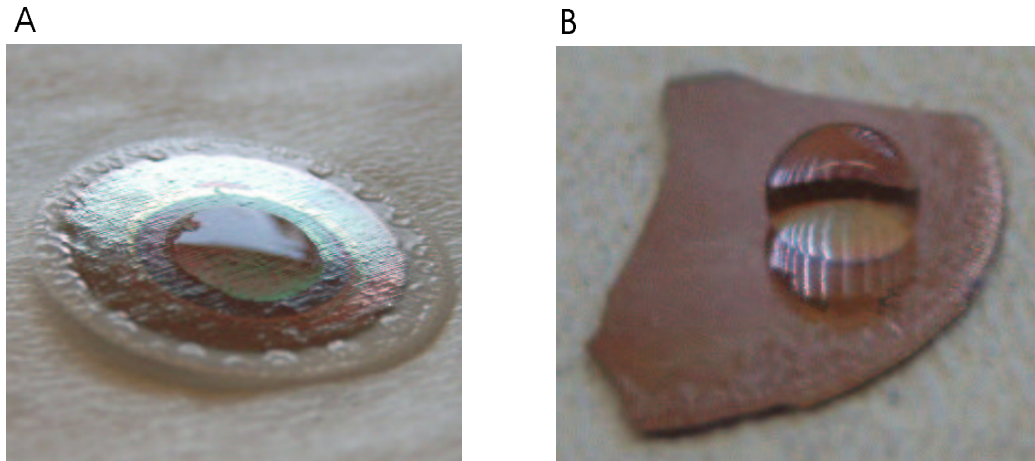


Abb. 4.30: Qualitative Kontrolle der Oberflächenmodifikation durch Aufbringen eines Wassertropfens. Der große Kontaktwinkel zur Oberfläche zeigt die gelungene Hydrophobisierung der Porenstege (B), während vor der Funktionalisierung mit ODT oder DPPE Benetzung der Oberfläche stattfindet (A).

Durch Aufstreichen einer Lösung aus DPhPC und ODA in *n*-Dekan wurde anschließend die zweite Monoschicht bzw. die Doppelschicht zwischen den Stegen aufgebaut. Dieser Vorgang konnte impedanzspektroskopisch verfolgt werden. Dazu wurde der Phasenwinkel zwischen Strom und Spannung bei einer Frequenz von $f = 10^6$ Hz zeitabhängig aufgezeichnet (Abb. 4.31). Nach der Ausbildung einer Lipidmembran sollte bei dieser Frequenz der Elektrolytwiderstand das Impedanzspektrum dominieren (Abb. 4.11, 4.32). Direkt nach dem Aufbringen des Lösungsmittels liegt dieser Wert bei etwa 90° und nähert sich dann durch fortschreitendes Ausdünnen zu einer Lipiddoppelschicht dem Wert $\phi = 0^\circ$, der charakteristisch ist für den Elektrolytwiderstand. Abb. 4.32 zeigt ein Impedanzspektrum nach dem Ende des Ausdünnprozesses (○). Durch Anpassung der Parameter des Ersatzschaltbildes in Abb. 3.5 B oder C an die Meßwerte wurde die Membrankapazität zu $C_m = (0,5 \pm 0,3) \mu\text{F}/\text{cm}^2$ bestimmt. Das Impedanzspektrum des porösen Substrats allein (□) zeigt nur den Elektrolytwiderstand (Abb. 4.32), da wegen der Porenbödenöffnung die elektrischen Eigenschaften des Aluminiumoxids nicht mehr berücksichtigt werden müssen.

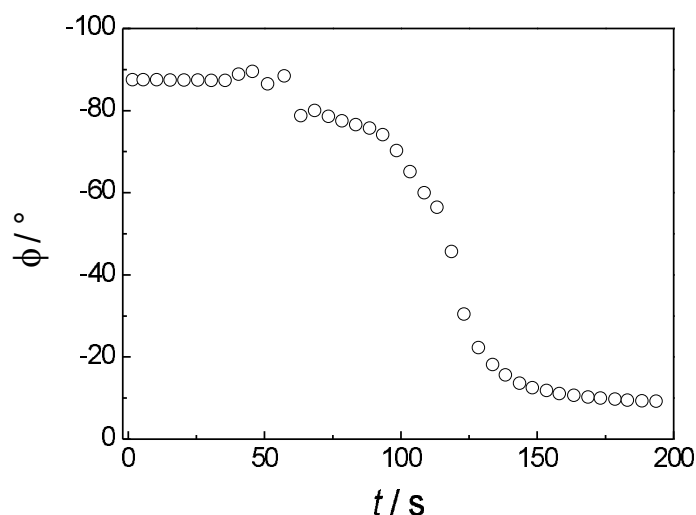


Abb. 4.31: Auftragung des Phasenwinkels zwischen Strom und Spannung bei einer Wechselstromfrequenz von $f = 10^6$ Hz gegen die Zeit nach Überstreichen eines porösen Aluminats mit einem lipidhaltigen Lösungsmitteltropfen. Die Abnahme des Phasenwinkels zeigt das Ausdünnen des Lipid-Lösungsmittel-Gemischs zu einer Lipiddoppelschicht.

Zur Untersuchung der Langzeitstabilität des nano-BLM-Systems wurden in regelmäßigen Abständen Impedanzspektren aufgenommen, um den Membranwiderstand zu extrahieren. Diese Ergebnisse werden zusammen mit der zeitlichen Entwicklung der Photoströme in Kap. 4.3.1.2 beschrieben.

Aktivitätsmessungen Wie Abb. 4.33 (1) zeigt, ist nahezu keine Photoreaktion des mit nano-BLMs überspannten porösen Aluminats zu beobachten. Das Fehlen oder die sehr geringe Ausprägung des Photoartefaktes nach dem Entfernen des Aluminiums kann als Hinweis auf die Bedeutung der Oxid-Metall-Grenzfläche für die großen Photoartefakte bei den Aluminaten mit geschlossenen Poren gewertet werden.

Nach der Adsorption von Purpormembranfragmenten konnte die Aktivität des Bacteriorhodopsins eindeutig durch Messung des lichtinduzierten Protonenstroms nachgewiesen werden (Abb. 4.33 (2)). Die Stromantwort ist gekennzeichnet durch zwei transiente Ströme beim Ein- und Ausschalten des Lichts. Im gezeigten Beispiel wurden Maximalstromdichten beim Einschalten von 170 nA/cm^2 erreicht.

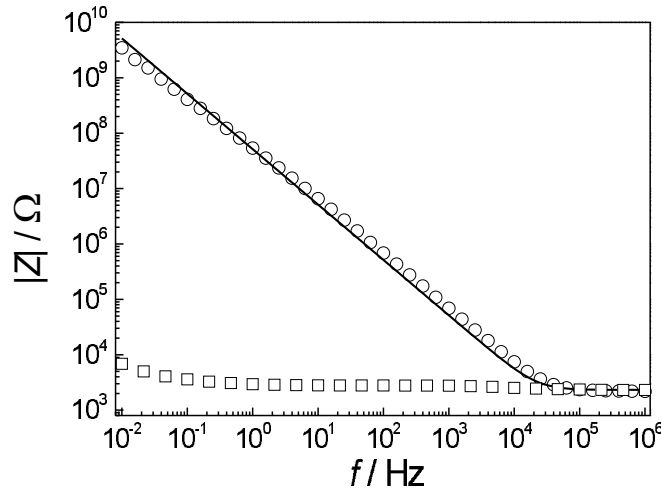


Abb. 4.32: Impedanzspektrum eines goldbeschichteten und mit DPPTE-funktionalisierten porösen Aluminats vor (□) und nach (○) der Ausbildung von nano-BLMs. Die durchgezogene Linie ist das Ergebnis einer Kurvenanpassung auf der Basis des in Abb. 3.5 C gezeigten Ersatzschaltbildes. Fitparameter: $C_m=0,77 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $R_e=2300 \Omega$.

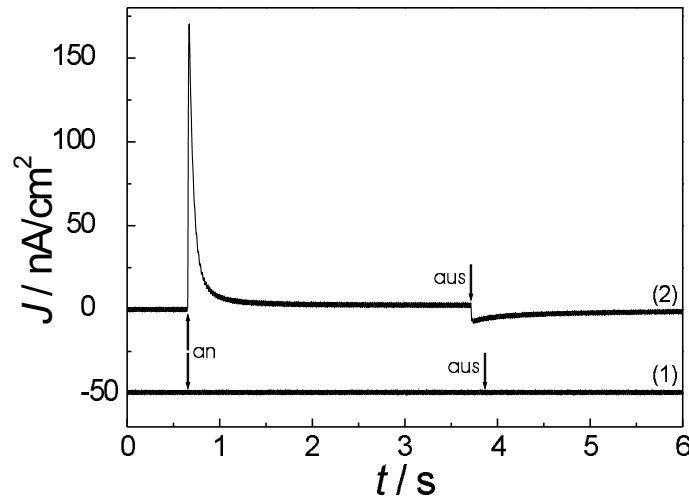


Abb. 4.33: Stromantwort von auf porösem Aluminat präparierten nano-BLMs vor (1) und nach (2) der Immobilisierung von Purpurmbranfragmenten. Die Immobilisierung erfolgte durch Inkubation mit beschallten PM-Fragmenten (0,1 mg/ml). Die Messung wurde in 10 mM Tris, 100 mM KCl, pH 7,4 durchgeführt. Der Photoartefakt ist zur besseren Übersichtlichkeit um $-50 \text{ nA}/\text{cm}^2$ verschoben.

Der Stromfluß fiel anschließend nicht auf $J = 0$ ab, sondern verblieb bis zum Ausschalten des Lichts auf einem Niveau von ca. $3 \text{ nA}/\text{cm}^2$. Der dargestellte Kurvenverlauf ist charakteristisch für alle Präparationen, die gemessenen Maximalstromdichten variierten jedoch in einem großen Bereich zwischen $30 \text{ nA}/\text{cm}^2$ -

300 nA/cm², was durch die Menge und Orientierung der adsorbierten Membranfragmente erklärt werden kann.

Im folgenden wurde die Maximalstromdichte beim Einschalten des Lichts als charakteristische Größe für den Pumpstrom des Bacteriorhodopsins gewählt. Abb. 4.34 A zeigt beispielhaft den zeitlichen Verlauf der Maximalstromdichten nach Zugabe der PM-Fragmente zum Zeitpunkt $t = 0$. Der kontinuierliche Anstieg der Maximalstromdichte verdeutlicht die zunehmende Immobilisierung von Bacteriorhodopsin auf der Oberfläche. Nach ca. 40 min schien dieser Prozeß bei einer Maximalstromdichte $J = 160$ nA/cm² abgeschlossen zu sein. Nach diesem schnell-

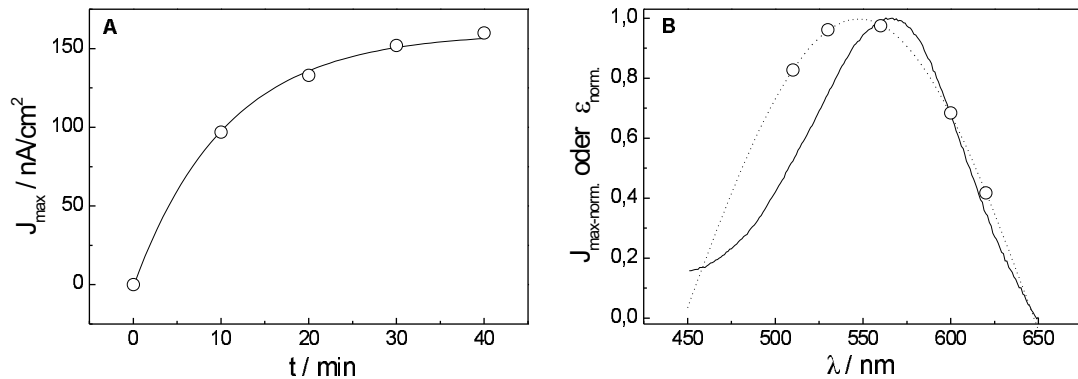


Abb. 4.34: Adsorption von Purpurmembranen an nano-BLMs **A** Zeitlicher Verlauf der Maximalstromdichten beim Einschalten des Lichts nach Zugabe der PM-Fragmente. Die durchgezogene Linie soll lediglich den Kurvenverlauf verdeutlichen. **B** Aktionsspektrum von Bacteriorhodopsin, immobilisiert auf nano-BLMs. Die wellenlängenabhängigen Maximalstromdichten wurden durch Verwendung von Interferenz-Bandfiltern erhalten und mit einem Faktor, der das Lampenspektrum berücksichtigt, korrigiert. Die gestrichelte Linie stellt einen Gauss-Fit an die Daten dar, die durchgezogene Linie ist das Absorptionsspektrum einer PM-Suspension.

len Adsorptionsprozeß schloß sich jedoch ein langsamerer Prozeß an, durch den die Maximalstromdichte nach drei Tagen auf einen Wert von $J = 300$ nA/cm² anstieg. Diese Beobachtung kann durch weitere PM-Adsorption und eine mögliche laterale Reorientierung der Membranfragmente erklärt werden. Überschüssige PM-Fragmente wurden durch Spülen mit Puffer entfernt. Der lichtinduzierte Protonenstrom wurde dadurch nicht beeinträchtigt, was auf eine irreversible Bindung der Purpurmembranen an die Lipiddoppelschicht schließen läßt.

Aktionsspektrum Zur weiteren Charakterisierung des lichtinduzierten Protonenstroms wurde ein Aktionsspektrum aufgenommen. Abb. 4.34 B zeigt die Maximalstromdichten beim Einschalten des Lichts in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Die Daten wurden mit einer Gauss-Funktion angefittet. Zum Vergleich ist das Absorptionsspektrum einer PM-Suspension gezeigt mit dem charakteristischen Absorptionsmaximum von Bacteriorhodopsin bei $\lambda_{max}=568\text{ nm}$. Das Aktionsspektrum von an nano-BLMs adsorbierten Purpurmembranen ist im Vergleich dazu um ca. 20 nm rotverschoben.

Theoretische Beschreibung der lichtinduzierten Protonenströme Die theoretische Beschreibung von lichtinduzierten Protonenströmen wurde für den Fall von an *painted membranes* adsorbierten Purpurmembranen bereits in Kap. 4.3.1.1 ausführlich beschrieben. Zur Beschreibung der entsprechenden Protonen-

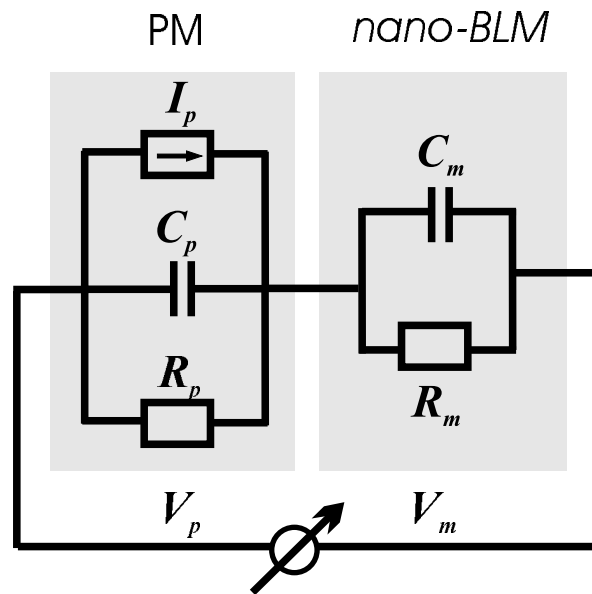


Abb. 4.35: Ersatzschaltbild zur Beschreibung der an nano-BLMs adsorbierten PM-Fragmente. I_p bezeichnet den Protonenstrom, der durch Belichtung des Bacteriorhodopsins erzeugt wird. Der Pfeil gibt die positive Stromrichtung an. R_p und C_p repräsentieren den Widerstand und die Kapazität der PM-Schicht, R_m und C_m sind die entsprechenden Parameter der nano-BLM. V_p und V_m bezeichnen den Spannungsabfall über den entsprechenden Elementen.

ströme bei Adsorption an nano-BLMs wurde nach demselben Prinzip verfahren. Bei den nano-BLMs befindet sich jedoch keine weitere Grenzschichtkapazität auf

der *trans*-Seite der Membran, so daß sich das in Abb. 4.35 gezeigte Ersatzschaltbild ergibt, bei dem nun die Membrankapazität aufgeführt wird. R_p und C_p repräsentieren erneut den Widerstand und die Kapazität der PM-Schicht, aktives Bacteriorhodopsin wird als Stromquelle $I_p(t)$ dargestellt. R_m und C_m sind der Widerstand und die Kapazität der Lipiddoppelschicht. Das zugrundeliegende sogenannte *sandwich*-Modell wurde als erstes von Bamberg^[39] für die Adsorption von Purpurmembranen an klassische BLMs beschrieben. Da bei der Beschreibung des Stromflusses durch poröse Aluminate der Stromfluß durch die Porenstege nicht berücksichtigt wird^[92], kann das für die klassischen BLMs entwickelte Modell unverändert für die Beschreibung des Protonenstroms bei Adsorption an nano-BLMs übernommen werden. Die Analyse dieses Netzwerks und Lösen der resultierenden Differentialgleichung

$$(C_p + C_m)\dot{V} + (G_p + G_m + \frac{I_{p0}}{V_*})V_p = I_{p0} \quad (4.16)$$

liefert folgendes Ergebnis für den Strom nach dem Einschalten des Lichts:

$$I(t) = I_{stat} + (I_{max,an} - I_{stat}) \exp\left(-\frac{t}{\tau_{an}}\right) \quad (4.17)$$

mit den Abkürzungen

$$I_{max,an} = I_{p0} \frac{C_m}{C_m + C_p} \quad (4.18)$$

$$I_{stat} = I_{p0} \frac{G_m}{G_m + G_p + \frac{I_{p0}}{V_*}} \quad (4.19)$$

und der Zeitkonstanten

$$\tau_{an} = \frac{C_m + C_p}{G_m + G_p + \frac{I_{p0}}{V_*}} \quad (4.20)$$

¹Leitfähigkeit $G = R^{-1}$

Für den Zusammenhang zwischen der Lichtintensität L und dem Pumpstrom I_{p0} und damit auch I_{max} , I_{stat} und τ_{an} gilt in diesem System die gleiche Abhängigkeit wie in Kap. 4.3.1.1 beschrieben:

$$I_{p0} = I_{p0}^s \frac{L}{L + L_{\frac{1}{2}}} \quad (4.21)$$

Der Zeitverlauf des Stroms nach dem Ausschalten des Lichts zum Zeitpunkt t' ergibt sich analog zu:

$$I(t') = -I_{max,aus} \exp\left(-\frac{t'}{\tau_{aus}}\right) \quad (4.22)$$

mit dem Maximalstrom $I_{max,aus}$ beim Ausschalten der Lichtquelle

$$I_{max,aus} = \frac{I_{p0}(G_m + G_p)}{G_m + G_p + \frac{I_{p0}}{V^*}} \left(\frac{G_m}{G_m + G_p} - \frac{C_m}{C_m + C_p} \right) \quad (4.23)$$

und der Zeitkonstanten

$$\tau_{aus} = \frac{C_m + C_p}{G_m + G_p} \quad (4.24)$$

Auch bei der Adsorption von Purpurmbranen an nano-BLMs gilt: Im Gegensatz zur Zeitkonstante τ_{an} beim Einschalten des Lichts ist die Zeitkonstante τ_{aus} beim Ausschalten unabhängig von der Lichtintensität.

Variation der Lichtintensität Auch bei Adsorption von Purpurmbranen an nano-BLMs sind den obigen Ausführungen zur theoretischen Beschreibung der Protonenströme zufolge die maximalen Stromdichten beim Ein- und Ausschalten des Lichts abhängig von der Lichtstärke (Gl. 4.18, 4.21, 4.23). Wie bei der Adsorption an *painted membranes* gilt dies auch für die Zeitkonstante τ_{an} beim Einschalten des Lichts, nicht aber für τ_{aus} (Gl. 4.20, 4.24). Um dies experimentell zu belegen, wurde das Substrat auch hier unter Verwendung unterschied-

licher Blendeneinstellungen an der Halogenlampe belichtet. Das Ergebnis zeigt Abb. 4.36. In Teil A sind die Maximalstromdichten gegen die relative Lichtintensität aufgetragen. Wie erwartet steigt die maximale Stromdichte mit zunehmender Lichtintensität an. Dies wird sehr deutlich beim Einschaltstrom, aber auch der Betrag der maximalen Ausschaltstromdichte nimmt geringfügig zu. In Teil B sind die reziproken Zeitkonstanten in Abhängigkeit von der relativen Lichtintensität aufgetragen. Auch hier wird die theoretische Vorraussage von den Meßwerten bestätigt. Während die Zeitkonstante τ_{an} beim Einschalten des Lichts mit zunehmender Lichtintensität abnimmt, zeigt τ_{aus} keine Abhängigkeit und bleibt auf einem konstanten Niveau.

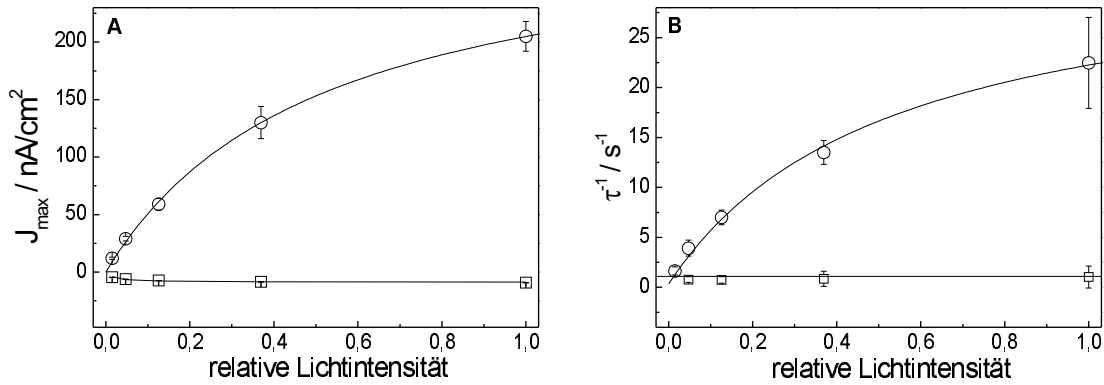


Abb. 4.36: PM adsorbiert an nano-BLMs **A** Abhängigkeit der Maximalstromdichten von der Lichtintensität, (○): $J_{max,an}$, (□): $J_{max,aus}$. Die durchgezogenen Linien sind das Ergebnis einer Kurvenanpassung mit den Gl. 4.18 und 4.23. **B** Abhängigkeit der Zeitkonstanten von der Lichtintensität, (○): τ_{an} , (□): τ_{aus} . Die durchgezogene Linie ist das Ergebnis einer Kurvenanpassung mit Gl. 4.20. τ_{aus} ist unabhängig von der Lichtintensität; Fitparameter: $C_m=1000$ nF/cm², $C_p=2000$ nF/cm², $G_m=10$ nS/cm², $G_p=1$ μ S/cm², $J_{p0}^s=(930 \pm 30)$ nA/cm², $L_{\frac{1}{2}}=(0,5 \pm 0,1)$, $V^*=(0,010 \pm 0,001)$ V

Einfluß des membranlöslichen Protonencarriers CCCP Bei der Adsorption von PM-Fragmenten an *painted membranes* konnte wegen des fehlenden zweiten, wäßrigen Kompartiments und der damit verbundenen Aufladung der Gold-elektrodenkapazität kein stationärer Strom gemessen werden. Bei der Präparation von nano-BLMs auf porösen Aluminaten stellen die Poren des Substrats dieses zweite Kompartiment dar, wodurch die Messung stationärer Ströme möglich sein

sollte. Dementsprechend liefert die Lösung der Differentialgleichung 4.16 für den Strom nach dem Einschalten des Lichts (Gl. 4.17) einen Parameter I_{stat} , der den stationären Strom repräsentiert und der nach Gl. 4.19 von der Leitfähigkeit der Lipiddoppelschicht G_m abhängt. Demnach sollte in diesem Fall durch Zugabe des Protonophors CCCP die Protonenleitfähigkeit der Membran und damit auch I_{stat} erhöht werden können. Nach Le Blanc^[101] ist die Leitfähigkeit der Lipiddoppelschicht linear abhängig von der Ionophor-Konzentration:

$$G_m = G_{m,0} + s c_{CCCP} \quad (4.25)$$

wobei $G_{m,0}$ die Leitfähigkeit bei unendlich niedriger CCCP-Konzentration ist, s eine Konstante und c_{CCCP} die CCCP-Konzentration in Lösung. Durch Kombination von Gl. 4.25 und 4.19 sollte demnach der stationäre Strom I_{stat} wie folgt von der CCCP-Konzentration abhängen:

$$I_{stat} = I_{p0} \frac{(G_{m,0} + s c_{CCCP})}{(G_{m,0} + s c_{CCCP}) + G_p + \frac{I_{p0}}{V^*}} \quad (4.26)$$

Abb. 4.37 A zeigt beispielhaft die Stromantwort von an nano-BLMs adsorbierten Purpormembranen bei zwei unterschiedlichen CCCP-Konzentrationen. Im Vergleich zur Stromantwort ohne CCCP (Abb. 4.33) ist bei beiden Graphen eine deutliche Erhöhung des stationären Stroms I_{stat} mit Stromdichten von $J_{stat}=73 \text{ nA/cm}^2$ ($40 \mu\text{M}$) bzw. $J_{stat} = 45 \text{ nA/cm}^2$ ($10 \mu\text{M}$) zu beobachten. Die stationären Ströme blieben auch während einer Belichtungsdauer von mehreren Minuten konstant, wie Abb. 4.38 zeigt. Dieser Befund deutet auf eine ausreichende Protonenleitfähigkeit innerhalb der Poren senkrecht zur Membranebene hin.

Die Entwicklung der stationären Stromdichten in Abhängigkeit von der CCCP-Konzentration in Lösung ist in Abb. 4.37 B gezeigt. J_{stat} steigt mit zunehmender CCCP-Konzentration und damit zunehmender Protonenleitfähigkeit der Membran an, bis bei ca. $40 \mu\text{M}$ der Sättigungswert erreicht wird. Die Gültigkeit der Beziehung in Gl. 4.26 zeigt die Kurvenanpassung an die Daten, die als durchgezogene Linie dargestellt ist.

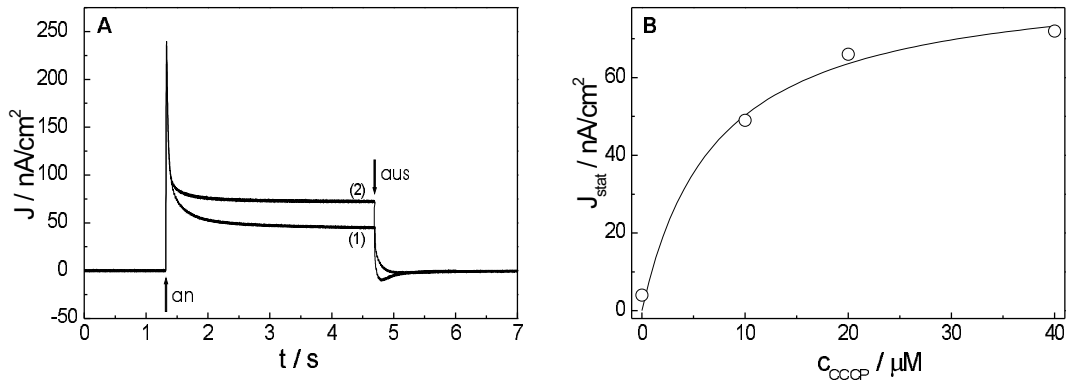


Abb. 4.37: **A** Stromantwort 15 min nach Zugabe von 10 (1) bzw. $40 \mu\text{M}$ (2) CCCP. **B** Stationäre Stromdichte J_{stat} in Abhängigkeit von der CCCP-Konzentration in Lösung. Der Wert von J wurde jeweils $1,5 \text{ s}$ nach Einschalten des Lichts ermittelt. Die durchgezogene Linie beschreibt den Kurvenverlauf basierend auf Gl. 4.26; Fitparameter: $G_m = 10 \text{ nS/cm}^2$, $G_p = 1 \mu\text{S/cm}^2$, $V^* = 0,010 \text{ V}$, $J_{p0} = (86 \pm 7) \text{ nA/cm}^2$, $s = (1343 \pm 330)$.

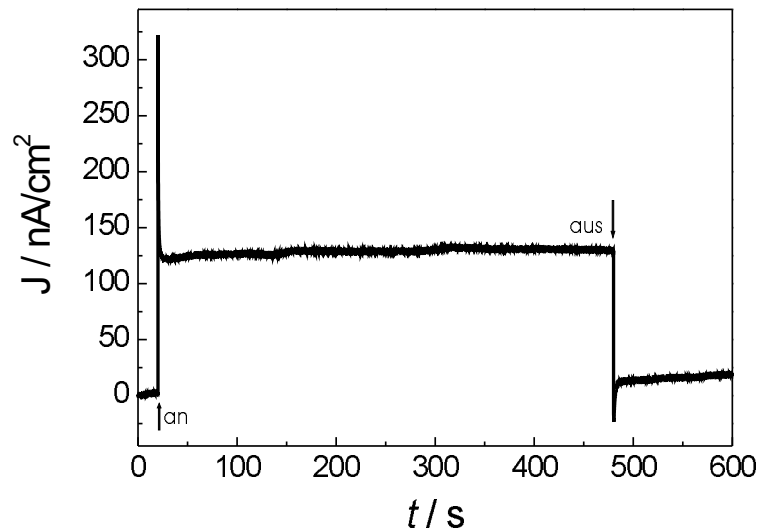


Abb. 4.38: Verlauf des stationären Stroms I_{stat} bei Dauerbelichtung über mehrere Minuten. Die Konstanz des stationären Stroms diesen Zeitraum hinweg zeigt, daß die Poren keine Diffusionsbarriere für die Protonen bilden.

Langzeitstabilität Die bisher in diesem Kapitel beschriebenen Experimente zeigen, daß bei der Adsorption von Purpurchromophoren an nano-BLMs ähnliche Ergebnisse erzielt wurden wie bei der Adsorption an klassische BLMs^[39]. Die Erhöhung der Protonenleitfähigkeit der nano-BLM durch Addition des Protonencarriers CCCP erlaubte sogar die Messung von stationären Strömen, eine Beobachtung, die zeigt, daß Protonen durch die porenüberspannende Membran in die

Nanokompartimente transportiert werden. Dies ist bei der Immobilisierung von Bacteriorhodopsin auf festkörperunterstützten Membranen (SSMs) wegen des fehlenden zweiten, wässrigen Kompartiments nicht möglich. Der Vorteil des letztgenannten Systems ist die Langzeitstabilität. Die Frage, ob das nano-BLM-System ebenfalls eine gewisse Langzeitstabilität aufweist und somit die Vorteile von klassischen BLMs und SSMs in sich vereint, sollte die Beobachtung der lichtinduzierten Photoströme über einen längeren Zeitraum klären. Sowohl die maximalen Stromdichten J_{max} beim Einschalten des Lichts als auch die stationären Stromdichten J_{stat} wurden in regelmäßigen Abständen aufgezeichnet. In Abb. 4.39 B sind diese Werte gegen die Zeit aufgetragen. Parallel dazu wurde mit Hilfe der Impedanzspektroskopie der Membranwiderstand R_m der porenüberspannenden Lipiddoppelschicht bestimmt (Abb. 4.39 A). Bei dem gezeigten Experiment lag eine CCCP-Konzentration von $c = 40\mu\text{M}$ vor. Nach drei Tagen wurde die Messkammer mit Puffer gespült, um überschüssige PM-Fragmente aus der Lösung zu entfernen. Der Membranwiderstand fiel nicht wie bei klassischen BLMs beobachtbar in einem Schritt auf den Elektrolytwiderstand ab, sondern fiel langsam von seinem Anfangswert $R_m = 0,1\text{ G}\Omega$ innerhalb von 18 Tagen auf einen Wert von $R_m = 0,46\text{ M}\Omega$. Im Gegensatz dazu verblieb J_{max} während des gesamten Experiments auf nahezu konstantem Niveau von $(310 \pm 10)\text{ nA/cm}^2$. Nach dem Spülen mit Puffer am dritten Tag sank J_{stat} leicht von seinem Anfangswert von 73 auf $(41 \pm 7)\text{ nA/cm}^2$, verblieb dann aber auf diesem Niveau. Nach 18 Tagen wurde das poröse Substrat mit Ethanol und Puffer gespült, um die porenüberspannende Membran zu zerstören. Durch impedanzspektroskopische Untersuchungen konnte anschließend nur der Elektrolytwiderstand nachgewiesen werden. Ebenso konnten keine lichtinduzierten Protonenströme mehr gemessen werden. Die in Abb. 4.39 gezeigten Ergebnisse wurden bei einer außerordentlich stabilen Präparation erhalten. Andere Experimente zeigten geringere Langzeitstabilität, die jedoch immer im Bereich von mehreren Tagen lag.

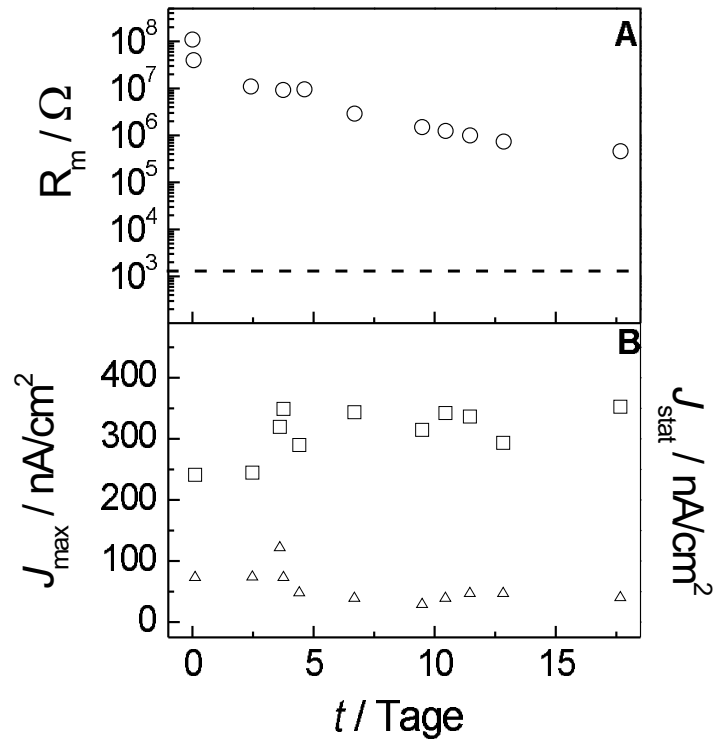


Abb. 4.39: **A** Zeitlicher Verlauf des Membranwiderstandes R_m , der mittels Impedanzspektroskopie ermittelt wurde. Die gestrichelte Linie zeigt das Niveau des Elektrolytwiderstandes an, das nach Zerstörung der Membran erreicht wird. **B** Zeitlicher Verlauf von Maximalstromdichte beim Einschalten des Lichts $J_{\text{max},an}$ und stationärem Strom I_{stat} .

4.3.2 Channelrhodopsin I und II in *Chlamydomonas reinhardtii*

Während bei der Immobilisierung von Bacteriorhodopsin auf planaren Goldoberflächen bei allen Oberflächenmodifikationsstrategien die Aktivität des Proteins an der Oberfläche festgestellt werden konnte, gelang dies bei den porösen Strukturen nur bei Adsorption von PM-Fragmenten an nano-BLMs. Daher wurde dieses System gewählt, um ein zweites lichtaktiviertes System zu adsorbieren und so die Eignung des Modellsystems für die Untersuchung lichtaktivierter Proteine zu unterstreichen. Es handelt sich bei diesem zweiten System um ganze Zellen, nämlich Grünalgen der Spezies *Chlamydomonas reinhardtii*. Diese reagieren auf Lichtreize mit Änderungen in ihrem Schwimmverhalten. Diese phototaktischen Reaktionen werden von einer Signalkette gesteuert, an deren Anfang die Öffnung der Kationenkanäle Channelrhodopsin I und Channelrhodopsin II steht.

Durch kapazitive Kopplung zwischen Algenmembran und festkörperunterstützter Lipiddoppelschicht ließen sich diese Ionenströme ebenfalls mit der für Purpurchlorobium beschriebenen Apparatur aufzeichnen. Die Zellwand der Algenzelle würde diese Kopplung stören. Daher wurde der Stamm CW2 verwendet, der einen durch chemische Mutagenese erzeugten Zellwanddefekt aufweist. Die Belichtung des Substrats erfolgte mit einer grünen Leuchtdiode. Vor der Immobilisierung auf porösen Substraten wurde wieder die Aktivität der Zellen auf planaren Goldelektroden getestet.

4.3.2.1 Aktivität auf planaren Goldoberflächen

Direkt nach Zugabe von Algen in die Meßkammer wurden lichtinduzierte Ströme beobachtet. Abb. 4.40 zeigt die entsprechende Stromantwort bei Belichtung von *Chlamydomonas*-Zellen adsorbiert an *painted membranes*. Sie ist gekennzeichnet

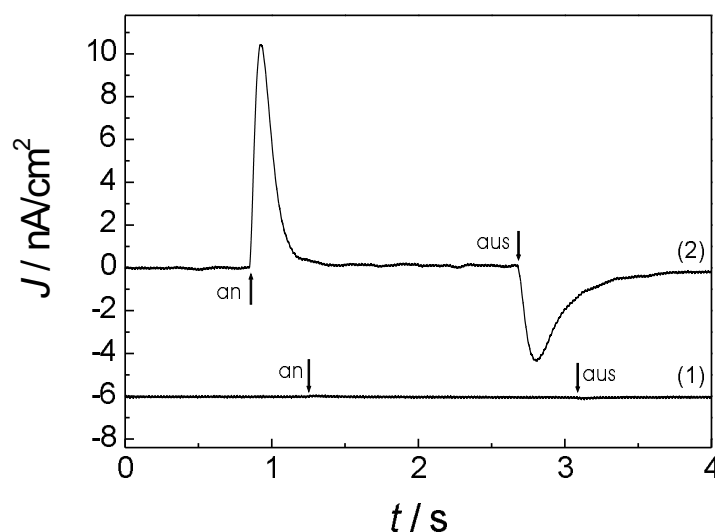


Abb. 4.40: Stromantwort von auf porösem Aluminat präparierten nano-BLMs vor (1) und nach (2) der Zugabe von *Chlamydomonas*-Zellen. Die Zugabe geschah durch Austausch eines Großteils des Meßpuffers gegen Zellsuspension ($OD = 0,25$). Die Messung wurde in NMM-Puffer pH 5,0 durchgeführt. Der Photoartefakt ist zur besseren Übersichtlichkeit um -6 nA/cm^2 verschoben.

durch zwei transiente Ströme beim Ein- und Ausschalten des Lichts. Die erhaltenen Maximalstromdichten lagen bei 11 nA/cm^2 . Bei einem anderen Experiment, gezeigt in Abb. 4.41, wurde der zeitliche Verlauf der Maximalstromdichte beim

Einschalten des Lichts verfolgt. Die Stromdichte stieg sehr schnell auf einen maximalen Wert von 5 nA/cm^2 an, um anschließend innerhalb von ca. 100 min auf einen Wert von $0,2 \text{ nA/cm}^2$ abzufallen. Danach konnte keine Photoaktivität mehr festgestellt werden.

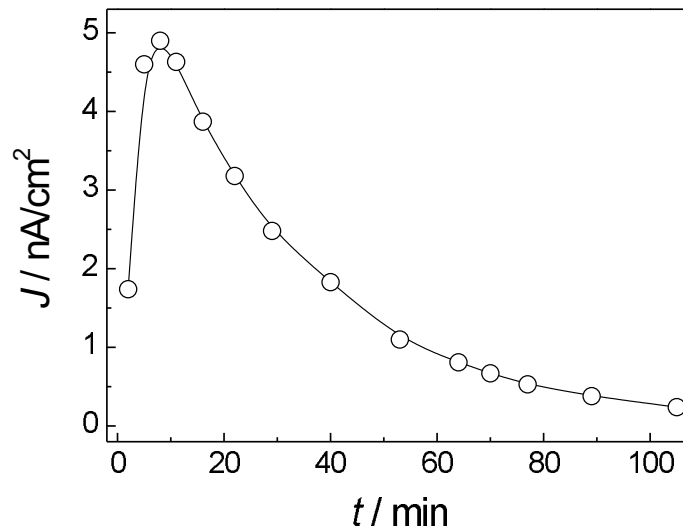


Abb. 4.41: Zeitlicher Verlauf der Maximalstromdichten beim Einschalten des Lichts nach Zugabe der *Chlamydomonas*-Zellen.

4.3.2.2 Aktivität auf porösem Aluminat

Die Adsorption von *Chlamydomonas*-Zellen an nano-BLMs lieferte ähnliche Ergebnisse wie bei Adsorption an *painted membranes* (Abb. 4.40). Es wurden wieder zwei transiente Ströme beim Ein- und Ausschalten der Lichtquelle gemessen, wie Abb. 4.42 A (2) zeigt. Die erhaltenen Stromdichten lagen mit $J=9 \text{ nA/cm}^2$ ebenfalls im gleichen Bereich. Der Photoartefakt bei Belichtung vor der Zugabe von Algen (1) zeichnete sich ebenfalls durch zwei transiente Ströme aus, die jedoch umgekehrte Vorzeichen im Vergleich zum *Chlamydomonas*-Signal aufwiesen. Sie sind auch in der Stromantwort (2) als kleine Peaks zu erkennen. In Abbildungsteil B ist wiederum der zeitliche Verlauf der Maximalstromdichte beim Einschalten dargestellt. Wie bei den *painted membranes* stieg der Photostrom relativ schnell an, erreicht sein Maximum aber erst nach etwa 40 min. Nach ca. 100 min ist kein Photosignal mehr zu beobachten.

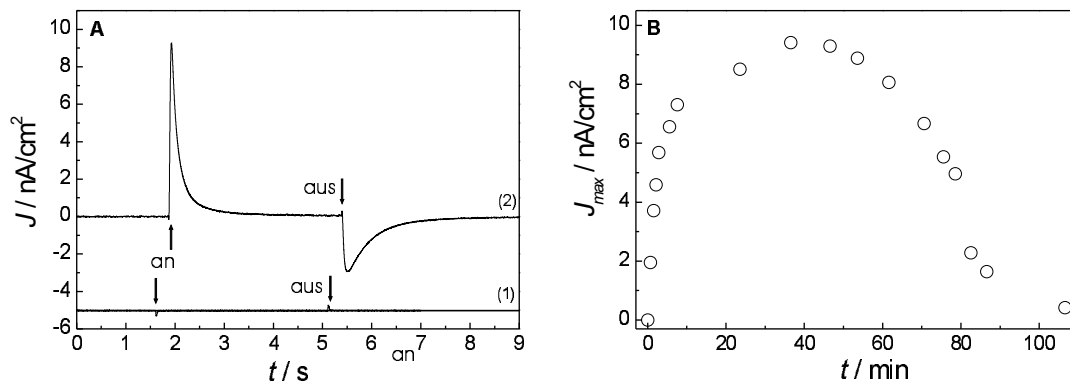


Abb. 4.42: **A** Stromantwort eines mit nano-BLMs überspannten porösen Aluminats vor (1) und nach (2) der Zugabe von *Chlamydomonas*-Zellen. Die Zugabe geschah durch Austausch eines Großteils des Meßpuffers gegen Zellsuspension ($\text{OD} = 0,25$). Die Messung wurde in NMM-Puffer pH 5,0 durchgeführt. Der Photoartefakt ist zur besseren Übersichtlichkeit um $-5 \text{ nA}/\text{cm}^2$ verschoben. **B** Zeitlicher Verlauf der Maximalstromdichten beim Einschalten des Lichts nach Zugabe der *Chlamydomonas*-Zellen.

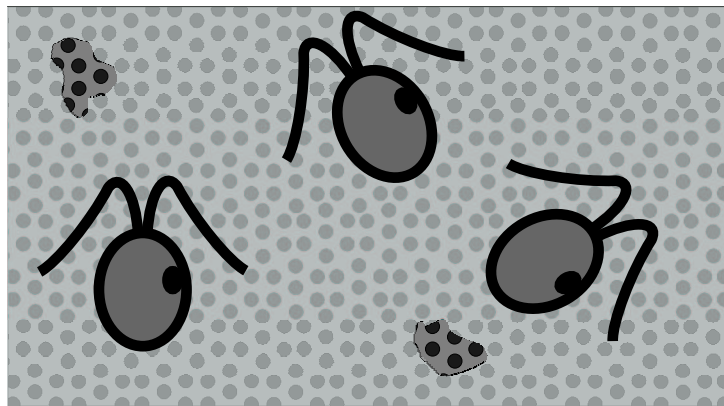


Abb. 4.43: Schematische Darstellung von nano-BLMs auf porösem Aluminat mit adsorbierten *Chlamydomonas*-Zellen. Außerdem sind zur Verdeutlichung der Membranbeschichtung zwei Defekte in der Membran gezeigt.

Wurden die Zellen direkt nach dem Ausschalten des Lichts erneut belichtet, konnte ein Adaptionsverhalten des Photostroms beobachtet werden. Die Maximalstromdichte bei der zweiten Belichtung geht dabei auf ca. 50 % des ersten Signals zurück, wie Abb. 4.44 zeigt. Eine weitere Reduzierung des Photosignals durch eine folgende dritte Belichtung konnte nicht festgestellt werden. Nach 15 s wurde diese Folge aus drei aufeinander folgenden Lichtpulsen wiederholt. Diese Regenerationszeitzeit reichte offensichtlich nicht, um bei der ersten Belichtung den

entsprechenden Wert der ersten Pulsfolge zu erhalten. Bei der zweiten und dritten Belichtung wurde die Maximalstromdichte hier sogar auf ca. 30 % der ersten Belichtung reduziert. Weitere Messungen zeigten, daß nach ca. 1 min Dunkelheit und erneuter Belichtung die Stromdichte ihren anfänglichen Wert wieder erreicht.

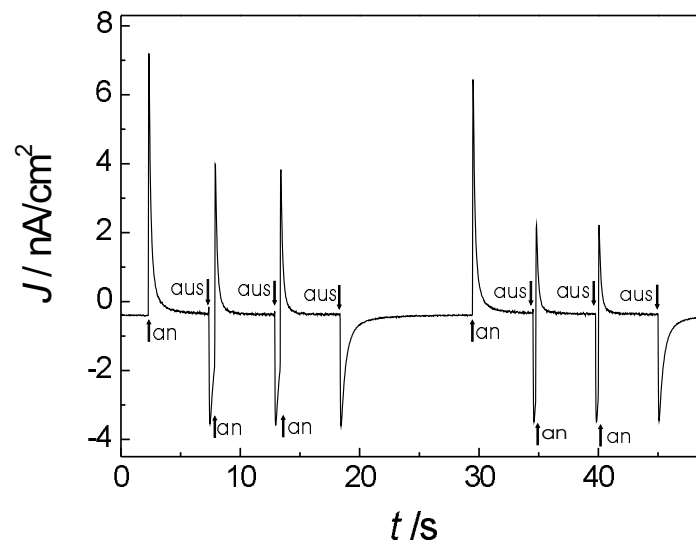


Abb. 4.44: Stromantwort eines mit nano-BLMs überspannten Aluminats nach der Zugabe von *Chlamydomonas*-Zellen bei direkt aufeinander folgenden Belichtungen. Der Photostrom zeigt ein Adaptionsverhalten.

5 Diskussion

Porenüberspannende Lipiddoppelschichten auf der Basis von porösen Aluminaten stellen einen relativ jungen Ansatz dar, die Vorteile von BLMs und SSMs in einem neuen Modellsystem für biologische Membranen zu vereinen. Hennesthal und Drexler^[35,92] konnten mit Hilfe von rasterkraft- und impedanzmikroskopischen Methoden zeigen, daß durch Vesikelspreiten auf der Aluminatoberfläche porenüberspannende Membranen präpariert werden können. Es wurde jedoch keine flächendeckende Beschichtung der Aluminate erreicht. Die resultierenden Membranwiderstände waren dementsprechend zu klein, um z. B. die Messung von Einzelkanalereignissen zu ermöglichen. Römer verfolgte daher einen anderen Ansatz, indem er analog zur Präparation von BLMs nach der Müller-Rudin-Technik^[5] oder der Präparation von *painted membranes* nach Florin^[14] eine Lösung aus DPhPC in n-Dekan auf das poröse Substrat aufstrich. Nach dem Ausdünnen zu einer Lipiddoppelschicht konnte er Membranwiderstände messen, die groß genug waren, um den Einbau von z. B. antibiotischen Peptidkanälen oder eines viralen Ionenkanals aus dem HI-Virus^[34,37] in die Lipiddoppelschicht durch Einzelkanalmessungen nachzuweisen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Eignung der porösen Aluminate als Modellsystem zur Untersuchung der Aktivität lichtaktivierter Proteine untersucht werden. Bacteriorhodopsin bietet sich in diesem Fall an, da es äußerst robust ist^[50] und auch ohne in Vesikel rekonstituiert oder vorher solubilisiert worden zu sein in Form von Purpurmembranfragmenten an Oberflächen adsorbiert werden kann. Neben dem Ziel, den bei Belichtung festkörperunterstützter Membranen oft störenden Photoartefakt zu charakterisieren und evtl. durch Substratmodifikationen

zu reduzieren, stand vor allem die Untersuchung der Langzeitstabilität und der Möglichkeit aufgrund des zweiten wäßrigen Kompartiments auch stationäre Ströme zu messen im Vordergrund. Die Reduzierung des Photoartefakts spielt z. B. auch eine wichtige Rolle im Hinblick auf den Einsatz von *Cage*-Verbindungen, die aktiviert durch einen intensiven Laserimpuls ein Gastmolekül freigegeben und so einen lokalen Konzentrationssprung erzeugen.

In dieser Arbeit wurden drei Strategien verfolgt Bacteriorhodopsin an der Oberfläche zu immobilisieren, die alle auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der modifizierten Aluminat-Oberfläche und dem Protein beruhten. Bei allen Strategien wurde zunächst die Immobilisierung des Proteins auf der jeweiligen funktionalisierten Oberfläche mit Hilfe der Quarzmikrowaage quantifiziert. Anschließend wurde die Aktivität des Proteins auf planaren Goldelektroden in Abhängigkeit von der Oberflächenfunktionalisierung untersucht, bevor die Eignung dieser Strategien bei Verwendung der porösen Aluminate als unterstützender Festkörper evaluiert wurde.

5.1 Oberflächenmodifikation mit Aminoalkanthiolen

Die Adsorption von PM-Fragmenten an eine Aminoalkanthiol-funktionalisierte Goldelektrode über elektrostatische Wechselwirkungen wurde bereits von Steinem^[63] ausführlich beschrieben. Dort wurde Mercaptoethylamin (MEA) verwendet, in dieser Arbeit kam zusätzlich Mercaptoundecylamin (MUA) zum Einsatz. Die Quarzmikrowaagemessungen zeigten, daß – im Gegensatz zu entsprechenden Messungen in der genannten Arbeit – zu einem gewissen Grad unspezifische Adsorption an die unbehandelte Goldelektrode stattfindet. Dies läßt sich möglicherweise auf Einflüsse des experimentellen Aufbaus, wie z. B. die Pumpgeschwindigkeit, oder der Probenvorbereitung zurückführen. Die Modifizierung der Goldelektrode mit Aminoalkanthiolen führte zu einer deutlich verstärkten Adsorption der Membranfragmente, wobei dieser Effekt bei Verwendung von MUA stärker aus-

geprägt war. Dies steht im Gegensatz zu den Photostrommessungen, bei denen unter Verwendung von MEA größere Stromdichten erzielt wurden. Es muß jedoch berücksichtigt werden, daß nicht nur die absolute Menge an immobilisiertem bR entscheidend ist für den meßbaren Stromfluß, sondern auch die Orientierung der einzelnen Purpurmbranfragmente. Daß dies durchaus ein kritischer Parameter ist, zeigten Untersuchungen von Bamberg et al.^[102], die Schwarze Membranen (BLMs) aus einer Lösung von Lipiden und Purpurmbranen in n-Dekan aufbauten. Sie registrierten bei jedem individuellen Experiment eine andere Stromrichtung und führten dies – ausgehend von einer zufälligen Orientierung der beiden PM-Seiten – nur auf die Varianz um den Fall $I = 0$ zurück.

Beide Seiten der Purpurmbran weisen eine negative Oberflächenladungsdichte auf, die intrazelluläre Seite ist jedoch stärker negativ geladen^[87–90]. Würde die Adsorption der PM-Fragmente nur über elektrostatische Wechselwirkungen erfolgen, so sollte diese Seite der Membranfragmente – und damit der C-Terminus des Proteins – bevorzugt zur Goldelektrode weisen. Dies würde aufgrund des vektoriellen Transports in Bacteriorhodopsin bedeuten, daß Protonen von der Elektrode weg transportiert würden, was der gemessenen Stromrichtung widerspricht. Die unspezifische Adsorption an die Goldelektrode zeigt, daß außer elektrostatischen auch noch andere Wechselwirkungen und die Morphologie der Membran eine Rolle spielen müssen. He et al.^[54] beobachteten bei der alternierenden Adsorption von Polykationen und PM-Fragmenten mit steigendem pH-Wert zunehmende Adsorption der PM-Fragmente und führten dies ebenfalls auf konkurrierende nichtionische Wechselwirkungen, wie van-der-Waals-Kräfte zurück. Bei dem verwendeten pH-Wert von 5,6 ist dieser Einfluß offenbar so groß, daß eine bR-Nettoorientierung mit dem N-Terminus zur Elektrode resultiert. In Kap. 4.2 wurde die verstärkte Adsorption bei der MUA-Beschichtung auf eine größere Oberflächenladungsdichte – bedingt durch dichtere Packung der längerkettigen Aminoalkanthiole – zurückgeführt. Den obigen Ausführungen zufolge bedingt dies auch, daß die Orientierung der PM-Fragmente verstärkt durch elektrostatische Kräfte getrieben wird. Dies bedeutet, daß der Anteil an PM-Fragmenten mit dem C-Terminus zur Elektrode steigt und somit die asymmetrische Verteilung der Fragmente bezüglich der Ori-

entierung zur Elektrode kleiner wird: Der Nettostrom sinkt.

Wegen der hohen Stromdichten, die bei Adsorption von PM-Fragmenten an so modifizierte Goldelektroden gemessen wurden, wurde diese Methode zur standardmäßigen Kontrolle der Aktivität des Proteins eingesetzt. Es lag nahe, dieses Verfahren einzusetzen, um Bacteriorhodopsin auch auf den porösen Aluminaten zu immobilisieren. Dabei wurden folgende Ergebnisse erhalten:

- Schon vor der Inkubation von PM-Fragmenten mit der funktionalisierten Aluminatoberfläche wurden ausgeprägte Photoströme, auch Photoartefakte genannt, gemessen.
- Es wurde eine Abhängigkeit des Ausmaßes der Photoartefakte von der Porengröße festgestellt.
- Die vermeintlichen bR-induzierten Signale und die jeweiligen Photoartefakte waren in Form und Größe sehr ähnlich und konnten daher nicht voneinander diskriminiert werden.

Photoartefakte wurden auch bei Immobilisierung von Bacteriorhodopsin auf anderen Festkörperoberflächen diskutiert. Steinem et al.^[103] und Puu et al.^[44] verwendeten Gold- bzw. Platinelektroden und detektierten Photoartefakte, die um mehrere Größenordnungen kleiner waren als das bR-induzierte Signal. Seifert et al.^[43] verwendeten ebenfalls Goldelektroden auf denen sie *painted membranes* präparierten. Sie beschrieben den Photoartefakt als variabel und unreproduzierbar und wiesen darauf hin, daß gerade Bestrahlung mit kleinen Wellenlängen durch Wechselwirkung des Lichts mit der Goldelektrode zu elektrischen Photoströmen führen kann. Es sei daher unerlässlich Kontrollexperimente durchzuführen, um Protein-induzierte Signale von Photoartefakten zu diskriminieren. Als Hauptursachen für die unerwünschten Ströme nannten sie Ladungstrennung in den Lipidmolekülen und den Photoeffekt der Goldoberfläche nach Absorption von Photonen im Metall. Dolfi et al.^[104] präparierten eine gemischte Alkanthiol/Phospholipid-Doppelschicht auf einer Quecksilber-Tropfen-Elektrode und adsorbierten daran PM-Fragmente. Sie stellten das absolute Fehlen von Photoartefakten heraus und

wiesen daher auf die Eignung dieses Systems hin, photolabil geschützte Substrate, wie z. B. *caged* ATP einzusetzen.

Die Bedeutung von Seiferts Forderung nach Kontrollexperimenten, um den Ursprung des Photostroms eindeutig zu belegen, zeigt sich ganz deutlich bei der in dieser Arbeit vorgenommenen Immobilisierung von Bacteriorhodopsin auf Aminoalkanthiol-modifizierten Aluminaten. Die nach der Inkubation mit PM-Fragmenten aufgezeichneten Signale könnten für sich genommen auch als bR-induzierte Ströme interpretiert werden. Erst der Vergleich mit dem vorher aufgezeichneten Photoartefakt macht deutlich, daß eine Unterscheidung nicht möglich ist und somit nicht auf die Aktivität des Proteins geschlossen werden kann.

Die Tatsache, daß bei allen verwendeten Aluminaten eine transiente Komponente beobachtet wurde, deutet darauf hin, daß die Oxid-Metall-Grenzfläche der Aluminate dabei eine Rolle spielt. Das Oxid weist eine gewisse Ionenbeweglichkeit auf^[80]. Lichteinstrahlung könnte somit zu einer Ladungsverschiebung im Oxid und der damit verbundenen Aufladung der Grenzschichtkapazität führen. Die Reduzierung des transienten Anteils des Photoartefaktes bei mehrfacher, direkt aufeinander folgender Belichtung ist ein weiterer Hinweis auf die Aufladung der Grenzflächenkapazität. In diesem Fall reicht die Zeit offensichtlich nicht aus, um den Kondensator zu entladen. Der immer noch beobachtbare Rechteckstrom ist vermutlich auf lichtinduzierte Ladungsträgerverschiebungen innerhalb des Aluminiums zurückzuführen. Der Einfluß der Oxid-Metall-Grenzfläche auf den Photoartefakt wird auch in der variierenden Maximalstromdichte bei den drei unterschiedlich hergestellten Aluminaten deutlich. Der entscheidende Parameter scheint dabei nicht die Gesamtporösität zu sein, sondern der Porendurchmesser an der Oberfläche. Vergleicht man geordnete und ungeordnete Oxalsäure-geätzte Aluminate, so ist zu bedenken, daß die an der Oberfläche ungeordnete Porenstruktur mit zunehmender Tiefe der Poren in eine geordnete Struktur übergeht^[80] und somit an der Oxid-Metall-Grenzfläche beide Substrate vergleichbare Porösität und Porendurchmesser aufweisen. Der größere Photoartefakt bei der geordneten Oberflächenstruktur ist demnach auf die größeren Porendurchmesser an

der Oberfläche zurückzuführen: Je kleiner die Poren, desto wahrscheinlicher wird eingestrahktes Licht an den Porenwänden absorbiert und reflektiert und desto kleiner ist die lichtinduzierte Aufladung der Oxid-Metall-Grenzfläche. Bestätigt wird dies durch den bei Phosphorsäure-geätzten Aluminaten beobachteten Photoartefakt, der bei geringerer Porösität, aber größerem Porendurchmesser im Vergleich zu den geordneten Oxalsäure-Substraten deutlich größer ist. Darüber hinaus ist denkbar, daß auch der beim Ätzprozeß verwendete Elektrolyt das Ausmaß des Photoartefakts beeinflußt, da er u. a. den Einbau unterschiedlicher Anionen ins Oxid^[80] und damit unterschiedliche Ionenbeweglichkeiten bedingt.

Ein weiteres Problem bei der Immobilisierung von bR auf den Aluminaten stellt möglicherweise die im Vergleich zur planaren Goldoberfläche reduzierte Oberflächenladungsdichte des porösen Substrats dar. Bei Verwendung von ungeordneten Poren waren die gemessenen Stromantworten, in Übereinstimmung mit den obigen Ausführungen zum Einfluß der Porengröße, mit $J = 13\text{--}17 \text{ nA/cm}^2$ vergleichsweise klein. Durch immobilisiertes Bacteriorhodopsin induzierte Protonenströme sollten in diesem Fall am ehesten nachweisbar sein. Da jedoch auch nur ein dem Photoartefakt entsprechendes Signal aufgezeichnet wurde, liegt die Vermutung nahe, daß kein oder nur sehr wenig PM-Fragmente an der Oberfläche adsorbiert wurden. Geht man bei einer planaren Goldoberfläche von 100 %iger Beschichtung mit Aminoalkanthiolen aus, so ist dieser Anteil und damit auch die Oberflächenladungsdichte bei den porösen Substraten um die jeweilige Porösität, also den Anteil der Poren an der Gesamtfläche, reduziert. Dies sind bei den ungeordneten Aluminaten $(17 \pm 3) \%$, bei den geordneten $(36 \pm 7) \%$ und bei den Phosphorsäure-geätzten $(33 \pm 4) \%$ ^[52, 92]. Die Adsorption der Purpurmbranen sollte zu einem gewissen Anteil über elektrostatische Wechselwirkungen erfolgen. Die porositätsbedingte Verringerung der Oberflächenladungsdichte schränkt dies offenbar stark ein.

Selbst wenn man von einer ausreichenden Immobilisierung von Purpurmbranen auf der porösen Oberfläche ausgeht, gibt es einen weiteren Grund, der das

Ausbleiben signifikanter Photoströme erklären könnte. Das Oxid weist keine nennenswerte Leitfähigkeit für Protonen auf, d. h. die Messung von Protonenströmen kann nur über die Aufladung der Elektrolyt-Oxid-Grenzflächenkapazität erfolgen. Würde jedoch kein Potential aufgebaut, da z. B. eine gewisse Protonenleitfähigkeit zwischen Purpurmembran und Substrat besteht, könnte kein transienter Strom gemessen werden. Bedenkt man, daß die Membranfragmente wegen der reduzierten Oberflächenladungsdichte eventuell „recht locker“ auf den Poren adhäreren, so ist das Auftreten einer Protonenleitfähigkeit unter der Purpurmembran nicht unwahrscheinlich.

Durch Ablösen der porösen Schicht (Abb. 4.27) und anschließendes Aufputtern einer Goldschicht auf dem verbleibenden Barriereoxid wurde der Photoartefakt deutlich reduziert. Nach der Immobilisierung von PM-Fragmenten auf diesem Substrat konnten Bacteriorhodopsin-induzierte Photoströme eindeutig nachgewiesen werden. Dies kann als weiterer Hinweis auf die Bedeutung der Oxid-Metall-Grenzfläche und der reduzierten Oberflächenladungsdichte gewertet werden.

Zusammenfassend läßt sich für die Immobilisierung von PM-Fragmenten auf porösen Aluminaten bei Beschichtung der Porenstege mit Aminoalkanthiolen festhalten, daß es mit Hilfe der Strommessungen nicht zu klären ist, ob überhaupt PM-Fragmente an der Oberfläche adsorbiert wurden oder ob dies aufgrund der porenbedingten, reduzierten Wechselwirkung mit der Oberfläche stark eingeschränkt war. Daher wurde nach Möglichkeiten gesucht, zum einen den Photoartefakt zu reduzieren und zum anderen die Oberflächenladungsdichte des porösen Substrats zu erhöhen. Im nächsten Kapitel wird der Einfluß einer Beschichtung mit Polyelektrolyt-Multischichten auf diesen Sachverhalt diskutiert.

5.2 Oberflächenmodifikation mit Polyelektrolyt-Multischichten

Da sich die Adsorption von PM-Fragmenten auf Aminoalkanthiol-beschichteten Aluminaten aufgrund von oben genannten Gründen als nicht geeignet erwies, die Aktivität von Bacteriorhodopsin an der Oberfläche nachzuweisen, wurden die Poren des Substrats mit Polyelektrolyt-Multischichten (PEM) überspannt. Da bei früheren, eigenen Untersuchungen^[98] zur Immobilisierung von bR auf PEM die Aktivität des Proteins, rekonstituiert in Vesikel, nicht aber in PM-Fragmenten festgestellt wurde, wurden im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich bR-haltige Vesikel verwendet.

Das Ausbleiben von bR-induzierten Strömen bei Verwendung von Purpurmembranen wurde damals auf unzureichende Wechselwirkung der rigiden Membran mit den Polyelektrolyt-Kissen zurückgeführt. In der Literatur finden sich jedoch Untersuchungen zu Multischichtstrukturen, bestehend aus alternierenden Lagen von PM-Fragmenten und dem Polykation PDAC. Li et al.^[105] bauten Schichtstrukturen aus bis zu 90 PDAC/PM-Doppelschichten auf und studierten die Lebensdauer des M-Intermediats im bR-Photozyklus. He et al.^[106] konnten bR-induzierte Photoströme in diesem System messen. Sie stellten eine kontinuierliche Zunahme der Photostromdichten bis zu einem Maximum bei acht PDAC/PM-Doppelschichten fest. Bei Adsorption weiterer Schichten sank die maximale Stromdichte wieder.

Die Strategie, Multischichten aus PDAC und PM aufzubauen, wurde in dieser Arbeit nicht verfolgt, da nicht die Charakterisierung von Bacteriorhodopsin, sondern die Eignung der porösen Aluminate als Modellsystem im Vordergrund stand. Bei bis zu 90 PDAC/PM-Doppelschichten wie z. B. bei Li würden wohl eher Effekte innerhalb dieses Schichtvolumens eine Rolle spielen und nicht Vorgänge an der Oberfläche der Aluminate. He stellte außerdem fest, daß die Verwendung von basischen pH-Werten die Adsorption von PM-Fragmenten begünstigt und führte dies auf eine größere Ladungsdichte der PM-Oberfläche zurück. Da das hier neben

PDAC verwendete Polyethylenimin (PEI) aber ebenfalls pH-abhängig ist, wurde dieser Ansatz nicht verfolgt und stattdessen – wie bereits erwähnt – Bacteriorhodopsin in Vesikel rekonstituiert, statt PM-Fragmente zu adsorbieren.

Die Quarzmikrowaagemessungen zur Adsorption der bR-haltigen Vesikel, die zu einem Anteil von 10 % negativ geladene Phospholipide enthielten, zeigten, daß sie bei allen verwendeten Polykationen an die Oberfläche adsorbierten. Die unterschiedlichen, maximalen Frequenz- und Dissipationsänderungen bei den verschiedenen Polykationen können durch die Unterschiede in der chemischen Struktur (PDAC) bzw. im Molekulargewicht der Polymere (PEI), die das Adsorptionsverhalten der Vesikel beeinflussen, erklärt werden.

Besonders sei darauf hingewiesen, daß bei Adsorption an eine Doppelschicht aus PSS/PEI750K die detektierte Frequenzänderung kleiner war als an eine einzelne PEI750K-Schicht. Dies ist auf Interkalation der unterschiedlich geladenen Polyelektrolyt-Schichten zurückzuführen. Diese Verwebung der benachbarten Schichten wurde mit verschiedenen Techniken wie Neutronen-Reflektometrie^[107], Förster-Energie-Transfer^[108] und radioaktivem Labeln der geladenen Spezies^[109] untersucht. Da sich die elektrischen Felder der einzelnen Schichten ebenfalls gegenseitig durchdringen, resultiert netto eine reduzierte Ladungsdichte an der Oberfläche.

Die großen Frequenz- und Dissipationsänderungen bei der Adsorption der Vesikel, sowie das Ausbleiben eines zweistufigen Prozesses zeigen, daß sie nicht zu einer planaren Lipiddoppelschicht spreiten, sondern intakt auf der Oberfläche verbleiben. Trotzdem wurden signifikante lichtinduzierte Ströme gemessen. Ein ähnliches System wird von Fendler et al.^[46] benutzt, um elektrogene Membrantransportproteine zu charakterisieren. Dort werden die Proteoliposomen allerdings an eine festkörperunterstützte Lipiddoppelschicht adsorbiert und die Messung der elektrischen Signale erfolgt durch kapazitive Kopplung der bR-haltigen Vesikel an die beschichtete Goldelektrode. Es ist denkbar, daß diese Kopplung zwischen den Vesikeln und der Elektrode unterbrochen wird, wenn die Vesikel

durch die Polykation-Schicht von der Elektrode separiert werden, da Polyelektrolyte prinzipiell ionenleitend sind und somit elektrisch gesehen einen endlichen ohmschen Widerstand darstellen. Entscheidend dafür, ob die Entkopplung stattfindet, ist das Verhältnis von Abstand des Vesikels und Kontaktfläche des Vesikels mit der Oberfläche. Ist die Kontaktfläche groß im Vergleich zum Abstand, so ist es unwahrscheinlich, daß der Ioneneinstrom in den Zwischenraum ausreicht, um Membran- und Elektrodenkapazität zu entkoppeln.

Die Kontaktfläche eines adsorbierten Vesikels hängt zum einen von der Adhäsionsenergie zwischen Vesikel und der Oberfläche ab, zum anderen von der Randspannung, die auftritt, sobald die Vesikelform aufgrund der Adsorption an die Oberfläche von der runden Idealform abweicht.^[110] Im hier vorliegenden Fall wirken starke attraktive Kräfte zwischen Vesikel und Oberfläche in Form von elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem positiv geladenen Polykation und den negativ geladenen Vesikeln. Dies sollte zu einer stark abgeflachten Form der adsorbierten Vesikel führen. Geht man von einem 50 nm-Vesikel aus, so sollte der Kontaktflächendurchmesser deutlich größer sein als diese 50 nm. Eine Grenzfallebetrachtung, die aufgrund einer extremen Abflachung davon ausgeht, daß praktisch kein Innenvolumen mehr vorhanden ist, ergibt eine Kontaktfläche mit einem Durchmesser von 70 nm. Die Dicke einer Polykation-Schicht wird in der Literatur mit Werten von 6-11 Å beschrieben^[54, 105, 111]. Dies bedeutet, daß der Abstand der Vesikel klein ist im Vergleich zur Kontaktfläche mit der Oberfläche. Die Größenverhältnisse sind in Abb. 5.1 A schematisch dargestellt. Wird in diesem System aufgrund des lichtgetriebenen Protonenflusses die Membrankapazität aufgeladen, reicht offensichtlich der Ioneneinstrom in den Zwischenraum wegen der gegebenen Dimensionen nicht aus, um Membran- und Elektrodenkapazität zu entkoppeln, wie die Detektion von Photoströmen zeigt.

Bei der Bedeckung der porösen Substrate liegt ein anderer Sachverhalt vor. Um vollständige Bedeckung der Poren zu gewährleisten, wurden mindestens fünf Doppelschichten aus alternierenden Anionen und Kationen aufgebaut. Dies hat zwei

Konsequenzen. Zum einen wird aufgrund der bereits angesprochenen Interkalation benachbarter Schichten die Ladungsdichte an der Oberfläche herabgesetzt, was vermutlich zu reduzierter Adsorption von Vesikeln und damit zu geringerer Proteinkonzentration an der Oberfläche führt. Zum anderen verhindert die ca. 10 nm dicke ionenleitende Schicht die kapazitive Kopplung von Lipidmembran und Elektrode, da in diesem Fall die geometrischen Verhältnisse durchaus Ioneneinstrom in das Polymerkissen zulassen.

Betrachtet man das Polymerkissen aufgrund seines hohen Wassergehalts als Fest-

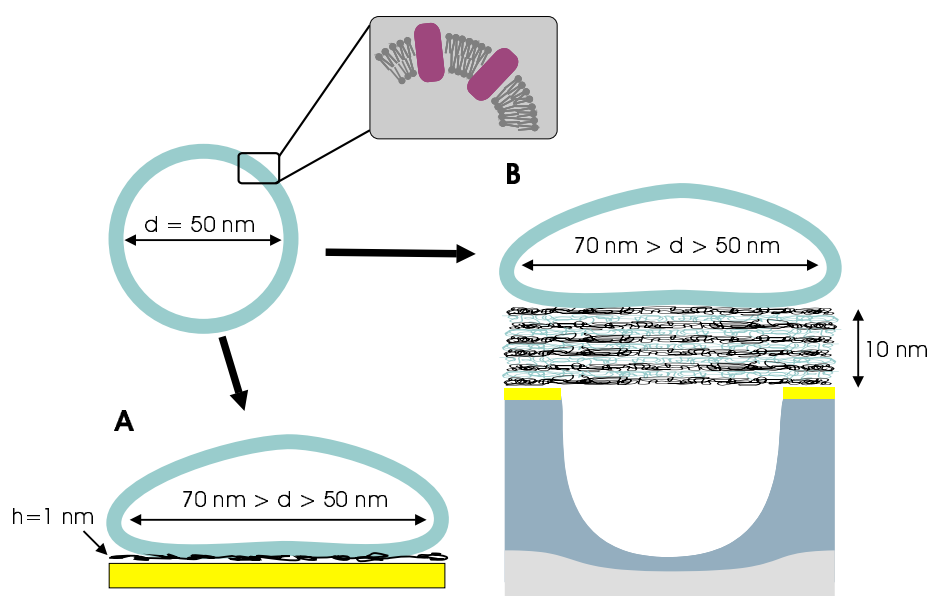


Abb. 5.1: Schematische Darstellungen: **A** Adsorption eines bR-haltigen Vesikels an eine Polykation-funktionalisierte Goldelektrode. Die Ausmaße der Polymer-Schicht sind klein im Vergleich zur Kontaktfläche der Membran mit der Oberfläche und kapazitive Kopplung daher möglich. **B** Adsorption eines bR-haltigen Vesikels an poröses Aluminat. Die Poren des Substrats sind mit Polyelektrolyt-Multischichten überspannt. Aufgrund des Abstandes der Vesikel von der Oberfläche und der Ionenleitfähigkeit des Polymerkissens ist keine kapazitive Kopplung möglich.

elektrolyt, so ist die Situation anschaulich mit einer bR-Vesikel-Suspension zu vergleichen, deren Belichtung auch kein elektrisch auswertbares Signal liefert. Trotzdem wurden manchmal wie im in Abb. 4.28 gezeigten Beispiel transiente Ströme gemessen, die deutlich größer waren als der Photoartefakt. Zum einen könnte dies auf einige gespreitete Vesikel zurückzuführen sein. Wenn die meisten Vesikel in-

takt adsorbieren und nur einige zu einer bR-haltigen Lipiddoppelschicht spreiten, wäre dies mit der Quarzmikrowaage nicht zu detektieren. Eine andere Möglichkeit ist, daß dieses Signal auch nur auf den Photoartefakt zurückzuführen ist. Letzterer ist sehr variabel und unreproduzierbar. Es ist daher möglich, daß bei dieser Messung zufällig vor der Immobilisierung von Bacteriorhodopsin ein sehr geringer Photoartefakt auftrat. Daß in den meisten Experimenten – unabhängig vom verwendeten Polykation – sich die Signale vor und nach der Zugabe der Vesikel sehr ähnlich waren und diese zudem den in Kap. 4.3.1.2 für ungeordnete Poren beschriebenen Artefakten ähneln, spricht für die zweite Hypothese. Die erhaltenen Maximalstromdichten waren bei allen Präparationen so klein, daß auch eine weitere Charakterisierung des Signals, z. B. durch Aufnahme eines Aktionsspektrums nicht möglich war. Dies war anders bei der dritten Strategie zur Immobilisierung von Bacteriorhodopsin. Die Ergebnisse werden im folgenden Kapitel diskutiert.

5.3 Oberflächenmodifikation mit Lipidmembranen

Die dritte Strategie zur Immobilisierung von Bacteriorhodopsin auf porösen Aluminaten beruhte auf der Adsorption von PM-Fragmenten an Lipiddoppelschichten, bei Präparation auf den Aluminaten auch nano-BLMs genannt. Zunächst wurde allerdings wieder die Adsorption der PM-Fragmente mit der Quarzmikrowaage quantifiziert und die Aktivität des Proteins immobilisiert auf Goldelektroden untersucht. Die Lipiddoppelschichten auf den planaren Goldelektroden werden nach Seifert^[43] als *painted membranes* bezeichnet.

Die im Vergleich zu Aminoalkanthiolschichten reduzierte Adsorption auf den *painted membranes* kann auf die unterschiedliche Oberflächenladungsdichte bei den beiden Modifikationsstrategien zurückgeführt werden. In der Lipiddoppelschicht ist aufgrund des Mischungsverhältnisses von Lipid zu Octadecylamin nur jedes 40. Molekül positiv geladen, während bei den Thiolschichten fast jedes chemisorbierte Molekül eine positive Ladung trägt. Der unterschiedliche pH-Wert – 5,6 bei den Aminoalkanthiolschichten und 7,4 bei den *painted membranes* – sollte diese Verhältnisse kaum verändern. Wenn man von einem für aliphatische Amine

gültigen pKs-Wert von 9 ausgeht, sind im ersten Fall 99,9%, im zweiten 97,5% der Aminogruppen protoniert. Die negativ geladenen Purpurmembranfragmente weisen bei dem höheren pH-Wert eine höhere Oberflächenladungsdichte auf und sollten die Adsorption über elektrostatische Wechselwirkungen daher bei diesem pH-Wert eher begünstigen. Bei der Adsorption an *painted membranes* ist zudem denkbar, daß auch nichtionische Wechselwirkungen die Adsorption beeinflussen.

Trotz der reduzierten Adsorption wurden signifikante lichtinduzierte Protonenströme gemessen. Die Messung der Ströme beruhte auf der kapazitiven Kopplung zwischen der planaren Lipidmembran und den PM-Fragmenten. Vergleicht man die hier erhaltenen Stromdichten mit denen bei Adsorption an Aminoalkanthiol-beschichtete Goldelektroden, so stellt man fest, daß sie um etwa den Faktor zwei niedriger sind, während die maximalen Frequenzänderungen bei den QCMD-Messungen sogar um einen Faktor 10 niedriger liegen. Dies kann wiederum durch die Orientierung der PM-Fragmente erklärt werden. Bereits in Kap. 5.1 wurde dargestellt, daß aufgrund von nichtionischen Wechselwirkungen und der Oberflächenmorphologie die PM-Fragmente hauptsächlich mit der extrazellulären Seite zur Goldelektrode adsorbieren, starke elektrostatische Wechselwirkungen jedoch den Anteil der umgekehrt orientierten Fragmente erhöhen können. Die größere Oberflächenladungsdichte bei der Aminoalkanthiol-Funktionalisierung sorgt also zum einen für verstärkte Adsorption, andererseits werden aber auch verstärkt Membranfragmente mit der intrazellulären Seite zur Goldelektrode adsorbiert, so daß der beobachtete Nettostrom nicht proportional mit der Anzahl an immobilisierten Bacteriorhodopsin-Molekülen steigt.

Die erhaltenen Stromdichten waren groß genug, um das Signal durch weitere Messungen zu charakterisieren. Im einzelnen wurden folgende Ergebnisse erhalten:

- Die Aufnahme eines Aktionsspektrums zeigt, daß die gemessenen Ströme tatsächlich auf die Pumpaktivität von Bacteriorhodopsin zurückzuführen sind. Es ist gegenüber dem Absorptionsspektrum von PM-Fragmenten in Lösung leicht rotverschoben.

- Durch die Messung des Protonenstroms unter Variation der Lichtintensität konnte die theoretisch bestimmte Abhängigkeit der Maximalstromdichten und der Zeitkonstanten der transienten Ströme von der Lichtintensität bestätigt werden.
- Nach Zugabe des membranlöslichen Protonencarriers CCCP wurden in Übereinstimmung mit den theoretischen Betrachtungen keine stationären Ströme gemessen.

Die Messungen bestätigen im Wesentlichen die von Seifert et al.^[43] gemachten Beobachtungen. Jedoch wurden im Rahmen dieser Arbeit keine stationären Ströme nach Zugabe von Ionophoren beobachtet. Bei dem hier verwendeten Ersatzschaltbild zur Beschreibung von *painted membranes* (Abb. 3.4 B) wird der Membranwiderstand vernachlässigt, da er so groß ist, daß keine nennenswerte Protonenleitfähigkeit besteht. Doch selbst wenn man davon ausgeht, daß dieser Widerstand durch Zugabe von Ionophoren reduziert wird, so verhindert die sich unter der Membran befindliche polarisierbare Goldelektrode einen kontinuierlichen Stromfluß und damit das Auftreten stationärer Ströme. Dies ist – neben evtl. Problemen bei der Rekonstitution großer Membranproteine – auch der große Nachteil dieses festkörperunterstützten Modellsystems.

Bei klassischen BLMs dagegen trennt die Lipiddoppelschicht zwei wäßrige Kompartimente, so daß die Messung stationärer Ströme möglich ist. Bamberg et al.^[39] zeigten dies für die Adsorption von PM-Fragmenten an BLMs, indem sie die Membran durch Zugabe von Gramicidin A oder des Protonencarriers FCCP protonenleitend machten. In einer weiteren Arbeit wurden auch stationäre Ströme bei Adsorption Halorhodopsin-haltiger Membranfragmente an eine BLM beobachtet, nachdem der Cl^-/OH^- -Carrier Triphenyltin zugegeben wurde^[42]. Abb. 4.38 zeigt, daß bei Adsorption von PM-Fragmenten an nano-BLMs ebenfalls stationäre Ströme gemessen wurden, die auch bei Dauerbelichtung über 10 min konstant blieben. Die Poren des Substrats bilden also keine Diffusionsbarriere für Protonen, was evtl. auf den Grotthuß-Mechanismus für Protonendiffusion^[112] zurückzuführen ist. Dieser geht davon aus, daß nicht einzelne Hydronium-Ionen

für den Protonentransport verantwortlich sind, sondern die Protonen entlang einer Kette von Wassermolekülen durch Umlagerung von Bindungen weitergegeben werden. Es ist denkbar, daß auch die Sauerstoff-Ionen an der Oberfläche des Aluminiumoxids an diesem Prozeß beteiligt sind. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, den Verlauf der stationären Ströme bei Immobilisierung von Halorhodopsin auf den porösen Aluminaten zu untersuchen, da in diesem Fall die Chlorid-Ionen das poröse Material durch "einfache" Diffusion durchqueren müßten. Im nano-BLM-System gibt es also ein großes wäßriges Kompartiment auf der *cis*-Seite der Membran und viele kleine in Gestalt der Poren auf der *trans*-Seite. Daher konnten die theoretischen Betrachtungen, die für das BLM-System entwickelt wurden, für das nano-BLM-System übernommen werden. Der Einfluß der Lichtintensität und der CCCP-Konzentration auf die lichtinduzierten Protonenströme wurde analog zu den Studien mit den klassischen BLMs untersucht, wobei vergleichbare Ergebnisse erhalten wurden. Ebenso wurde wie bei den klassischen BLMs eine leichte Rotverschiebung des Aktionsspektrums gegenüber dem Absorptionsspektrum von PM-Fragmenten in Lösung festgestellt.

Die Parallelen zwischen den beiden Systemen enden, wenn man die Langzeitstabilität der Membran betrachtet. BLMs werden hergestellt, indem man eine Lipidlösung in *n*-Dekan auf ein ca. 100 μm großes Loch in einer Teflonwand streicht. Durch Ausdünnen des Lipid-Lösungsmittelgemisches entsteht eine freitragende Membran, die nur 4-5 nm dick ist, aber die Ausdehnung des 100- μm -Lochs hat. Daß ein solches Gebilde gegenüber mechanischen Störungen und Adsorption von Membranfragmenten oder Vesikeln sehr anfällig ist, ist offensichtlich. In der Literatur wird die Lebensdauer solcher Membranen mit bis zu acht Stunden angegeben^[27, 113, 114]. Bei SSMs dagegen wurde die Aktivität von Bacteriorhodopsin auch nach über 48 h noch ohne Änderung der Signalqualität beobachtet^[43]. Auch bei der Messung von Protonenströmen bei Adsorption von PM-Fragmenten an nano-BLMs wurden im Rahmen dieser Arbeit Langzeitstabilitäten festgestellt, die weit über die Lebensdauer der klassischen BLMs hinausgehen. Bei allen Präparationen konnte der bR-induzierte Photostrom mehrere Tage lang ohne signi-

fikante Änderung gemessen werden, in einem Fall sogar 18 Tage lang, bevor die Membran absichtlich zerstört wurde. Wie Abb. 4.39 zeigt, nahm während dieser Zeit der Membranwiderstand im Gegensatz zum Photostrom kontinuierlich ab. Dies ist zu verstehen, wenn man davon ausgeht, daß die einzelnen Poren des Substrats voneinander entkoppelt sind. D. h. wenn die Membran über einigen Poren aufreißt, bleibt sie dank der stabilisierend wirkenden Stege zwischen den Poren über den anderen Poren intakt. Eine BLM hingegen wird komplett zerstört, wenn sie an einer Stelle aufreißt. Die beobachtete Langzeitstabilität ist auch im Vergleich zu nano-BLMs ohne adsorbierte Membranfragmente ungewöhnlich groß. Dies könnte wie folgt erklärt werden: Wenn man von einem Durchmesser der PM-Fragmente von $1\text{--}5\text{ }\mu\text{m}$ ausgeht^[115], so bedeckt ein Membranfragment ca. 7-170 membranüberspannte Poren. Teile der Lipidmembran, die von PM-Fragmenten bedeckt sind, werden durch die rigide, starre Purpurmembran stabilisiert, während nicht bedeckte Teile teilweise aufreißen und so die langsame Abnahme des Membranwiderstandes verursachen.

In Kap. 5.1 wurde das Auftreten von Photoartefakten unter anderem mit der Aufladung der Oxid-Metall-Grenzfläche in Zusammenhang gebracht. Bei den nano-BLMs wurde das Oxid entfernt, um eine siebartige Struktur mit durchgehenden Poren zu erhalten. Es traten in diesem System nur geringe Photoartefakte auf, was die gemachten Annahmen bestätigt. Nano-BLMs sollten daher auch dazu geeignet sein, weitere lichtaktivierte Proteine oder Reaktionen zu untersuchen, bei denen auch starke Lichtquellen wie Laser eingesetzt werden. Als Beispiel sei der Einsatz von *Cage*-Verbindungen oder das Studium von kinetischen Aspekten lichtaktivierter Proteine genannt.

Die Aktivität von Bacteriorhodopsin wurde auch genutzt, um andere Modellmembranen auf Basis poröser Festkörpersubstrate zu untersuchen. Moran et al.^[45] verwendeten *Millipore*-Filter, die mit einer Lösung aus Asolectin in n-Dekan imprägniert wurden. Kapazitätsmessungen legten nahe, daß keine Lipiddoppelschichten, sondern dickere Membranen aus Multischichten oder mit hohem Lösungsmit-

telanteil ausgebildet wurden. Nach der Zugabe von bR-haltigen Vesikeln konnten sie lichtinduzierte Photoströme und -Spannungen messen. Durch Variation des pH-Gradienten über das poröse Substrat zeigten sie, daß aber wohl aufgrund der geringen Ionenleitfähigkeit der Membran kein Protonentransport durch die Poren stattfindet. Ein Versuch, die Leitfähigkeit der Membran durch Zugabe von Ionophoren zu erhöhen, wurde nicht unternommen.

Die bei Adsorption von PM-Fragmenten an nano-BLMs erhaltenen Ergebnisse und der Vergleich mit der Aktivität von Bacteriorhodopsin in den zwei etablierten Modellsystemen – *painted membranes* und klassische BLMs – zeigen, daß das nano-BLM-System als Hybrid beider Modellmembranen aufgefaßt werden kann, daß die Vorteile beider in sich vereint. Zum einen ist die Messung stationärer Ströme möglich und es treten kaum Photartefakte bei Belichtung auf, zum anderen zeichnen sich nano-BLMs durch hohe Langzeitstabilität aus. Dies macht sie auch für die Untersuchung weiterer lichtaktivierte Prozesse interessant.

5.4 Photoströme *Chlamydomonas reinhardtii*

Bei der dritten Strategie, also der Immobilisierung von Bacteriorhodopsin durch Adsorption von PM-Fragmenten an nano-BLMs, konnte die Aktivität des Proteins an der Oberfläche eindeutig nachgewiesen werden. Daher wurde dieses System verwendet, um ein zweites lichtaktiviertes System zu untersuchen. Dabei handelt es sich um die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*. Harz et al.^[2, 2] konnten mit der *patch clamp*-Technik Rhodopsin-induzierte Photoströme messen, die durch Ca^{2+} -Ionen getragen wurden. Das Stromsignal bestand aus drei Komponenten, die alle als durch Kanäle fließende Ionenströme interpretiert wurden. Sie wurden als Photorezeptorstrom, der praktisch verzögerungsfrei auf das Lichtsignal folgte und in der Gegend des Augenflecks lokalisiert ist, sowie schneller und langsamer Flagellenstrom bezeichnet. Später adsorbierte Hufnagel *Chlamydomonas*-Zellen zum ersten Mal an festkörperunterstützte und Schwarze Membranen^[116]. Über kapazitive Kopplung der Zellmembran an die planaren Lipiddoppelschichten konnte

er transiente Ströme beim Ein- und Ausschalten des Lichts detektieren. Sie wurden dem Photorezeptorstrom zugeschrieben, da sie wie die erste Komponente bei den *patch clamp*-Messungen quasi verzögerungsfrei auf das Lichtsignal folgten. Lichtgesteuerte Ionenkanäle, die diese schnelle Kopplung von Photorezeptor und Ionenkanal erklären würden, waren bis dahin nicht bekannt. Tatsächlich identifizierten Nagel et al.^[59] ca. 10 Jahre später zwei lichtaktivierte Ionenkanäle, Channelrhodopsin I und Channelrhodopsin 2, aus dem Augenfleck der Alge und charakterisierten sie nach Expression in Oozyten als lichtaktivierte H^+ - bzw. Ca^{2+} -Kanäle.

Die Adsorption von *Chlamydomonas*-Zellen an das nano-BLM-System lieferte im Prinzip ähnliche Ergebnisse wie bei Hufnagel. Es wurden lichtinduzierte transiente Ströme gemessen, die analog zu Hufnagel dem Photorezeptorstrom, also dem Öffnen der Channelrhodopsin-Kanäle, zugeordnet werden können. Ferner wurde ebenfalls ein Adaptionsverhalten der Stromantwort nach Dauerbelichtung beobachtet, das nach Hufnagel auf Anreicherung eines langlebigen Intermediats im Photozyklus der lichtaktivierten Kanäle zurückgeführt werden kann. Ein zweiter Lichtpuls erzeugt dann ein entsprechend kleineres Signal.

Nach etwa 50 min wurde eine kontinuierliche Verringerung der maximalen Stromdichten beobachtet, was wie bei Hufnagel auf den Einfluß des Lösungsmittels auf die Zellen zurückgeführt wurde. Dennoch sollte diese Zeitspanne ausreichen, um weitere Untersuchungen an diesem System durchzuführen. Z. B. könnten *Chlamydomonas*-Mutanten verwendet werden, in denen die Expression der Channelrhodopsine reprimiert wird, um weitere Informationen zur Funktion der Proteine *in vivo* zu erhalten. So ist beispielsweise die Frage, ob die beiden Kanäle für das photophobische oder phototaktische Verhalten verantwortlich sind, in der Literatur umstritten.^[117, 118]

6 Zusammenfassung

Porenüberspannende Membranen auf der Basis poröser Aluminate stellen ein neues Modellsystem für biologische Membranen dar. In dieser Arbeit konnte die Eignung dieses System zur Untersuchung lichtaktivierter Proteine gezeigt werden. Ein wichtiger Aspekt dabei war die Charakterisierung und Reduzierung des Photoartefaktes. Als Modellprotein wurde mit Bacteriorhodopsin ein gut charakterisiertes und äußerst robustes Protein verwendet. Drei Strategien, die sich in der Art der Oberflächenfunktionalisierung unterschieden, wurden eingesetzt, um Bacteriorhodopsin über elektrostatische Wechselwirkungen an die Oberfläche der Aluminate zu adsorbieren. Die erste Strategie bestand in der Chemisorption von Aminoalkanthiolen an die Goldelektrode, die zweite in der Präparation von Polyelektrolyt-Multischichten. Bei der dritten Beschichtungsstrategie wurden die Poren mit nano-BLMs überspannt. Bacteriorhodopsin wurde entweder in Form von Purpurmembranfragmenten (Strategie 1 und 3) oder rekonstituiert in Lipidvesikel (Strategie 2) an die Substratoberfläche adsorbiert. Quarzmikrowaage- sowie Photostrom-Messungen zeigten, daß unter Verwendung planarer Goldelektroden als Festkörpersubstrate bei allen Strategien das Protein an der Oberfläche immobilisiert und bR-induzierte Photoströme gemessen werden konnten.

Bei Verwendung der porösen Aluminate bestand der erste Schritt stets in der Beschichtung der Porenstege mit einer dünnen Goldschicht. Zunächst wurden Substrate mit geschlossenen Poren verwendet. Es zeigte sich bei Immobilisierung von bR an die Aminoalkanthiol-beschichtete Oberfläche, daß auch unter Variation des Herstellungsprozesses der Aluminate das vermeintliche bR-Signal nicht vom Photoartefakt diskriminiert werden konnte. Auch bei der zweiten Strategie konnten aufgrund fehlender kapazitiver Kopplung von bR-Vesikeln an die

Oberfläche keine signifikanten Photoströme gemessen werden. Das Auftreten des Photoartefaktes in diesem System wurde der lichtinduzierten Aufladung der Oxid-Metall-Grenzflächenkapazität zugeordnet. Daher wurden bei der dritten Strategie offene Poren verwendet, die durch Ablösen des Aluminiums und anschließendes Entfernen des Barriereoxids durch chemisches Ätzen hergestellt wurden. Die Poren wurden mit Octadecylamin-haltigen nano-BLMs überspannt. Photoartefakte wurden nicht mehr beobachtet oder waren vernachlässigbar klein. Nach Adsorption von Purpormembranfragmenten konnte die lichtinduzierte Protonenpumpaktivität von Bacteriorhodopsin nachgewiesen werden, die sich im Auftreten transienter Ströme beim Ein- und Ausschalten des Lichts äußerte. Das Aktionsspektrum war im Vergleich zum Absorptionsspektrum des Proteins leicht rotverschoben, zeigte aber dennoch eindeutig, daß die gemessenen Ströme auf die Aktivität des Proteins zurückzuführen sind. Durch Messung der Maximalstromdichten und der Zeitkonstanten der transienten Ströme wurde gezeigt, daß das sogenannte *sandwich*-Modell – entwickelt für Adsorption von PM an klassische BLMs – auf das nano-BLM-System übertragen werden kann. Stationäre Ströme wurden gemessen, nachdem die Leitfähigkeit der Lipidmembran durch Zugabe von CCCP, einem membranlöslichen Protonencarrier, erhöht wurde. Die Konstanz der stationären Ströme auch über mehrere Minuten hinweg zeigt, daß Protonentransfer über die Membran erfolgt und eine ausreichende Protonenleitfähigkeit entlang der Poren gegeben ist.

Neben Bacteriorhodopsin wurde ein zweites lichtaktiviertes System an nano-BLMs adsorbiert. Durch kapazitive Kopplung der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* an die Membran konnten erneut lichtinduzierte Photoströme gemessen werden, die auf die Öffnung von Kationenkanälen im Augenfleck der Zelle zurückzuführen sind. Ein Adaptionsverhalten der Stromantwort wurde beobachtet.

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, daß ein Modellsystem, basierend auf porenüberspannenden Membranen in Zukunft durchaus einen Beitrag zur Charakterisierung von lichtaktivierten Proteinen und anderen lichtgesteuerten membrangebundenen Prozessen leisten kann.

7 Summary

Pore-suspending membranes based on porous alumina serve as a new model system for biological membranes. Within this study the suitability of the system for the investigation of light-activated proteins was shown. Because of its unique stability the well characterised protein bacteriorhodopsin was chosen as a model protein. To adsorb the protein to the surface of the alumina by electrostatic interactions three strategies, differing in the way of surface functionalisation, were used. The first one was based on chemisorption of aminoalkanethiols, the second one on the preparation of polyelectrolyte multilayers. In the third strategy nano-BLMs suspended the pores of the substrate. Bacteriorhodopsin was adsorbed using purple membranes (strategy 1 and 3) or bR-reconstituted lipid vesicles (strategy 2). Quartz crystal microbalance and photo current measurements showed that using planar gold electrodes as a solid support all strategies were suitable for immobilising the protein on the surface resulting in bR-induced photo currents.

When using porous alumina substrates a thin gold layer was sputtered on top in a first step. Initially pores with underlying aluminum and barrier oxide layers were used. Preparing the surface with aminoalkanethiols it turned out that the photoartefact and the supposed bR-signal could not be discriminated. This observation did not depend on the way of fabricating the substrate. Due to the missing capacitive coupling of the bR-vesicles to the surface no significant photocurrents were recorded using the second strategy either. The charging of the oxide-metal-interface was thought to be responsible for the occurrence of photoartefacts in this system. For this reason the aluminum and the barrier oxide were removed off the porous alumina substrates used in the third strategy. Afterwards the pores

were suspended with octadecylamin-containing nano-BLMs. Photoartefacts were no longer detected or very small. After adsorption of purple membranes transient currents were observed upon switching on and off the light, respectively, which was attributed to bacteriorhodopsin activity. An action spectrum was recorded which was slightly red-shifted but nevertheless unambiguously showed that the photocurrents reflect the electrical activity of the protein. By measuring the light-dependent maximum current densities and time constants of the transient currents it was demonstrated that the so-called *sandwich*-model, developed for the adsorption of PM to classic BLMs, can be transferred to the nano-BLM-system. Stationary currents were observed after increasing the conductance of the lipid bilayer by addition of the membrane-soluble protonophore CCCP. These currents were stable for several minutes indicating that protons are transported across the lipid bilayer and that there is a sufficient proton conductance along the pores.

A second light-activated system was adsorbed to the nano-BLMs. By capacitive coupling of the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii* light-induced currents were observed which can be attributed to the opening of cation channels in the eyespot of the cell. Upon multiple light exposure an adaption behaviour of the current response was observed.

The results presented in this work show that in the future a model system based on pore-suspending membranes can contribute to the characterisation of light-activated proteins and further light-controlled membrane-related processes.

Literaturverzeichnis

- [1] Gorter, E. and Grendel, F., **1927** Biolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 29, 314–317.
- [2] Singer, S. and Nicolson, G., **1972** The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175, 720–731.
- [3] Simons, K. and Ikonen, E., **1997** Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633), 569–72.
- [4] Brown, D. A. and London, E., **1998** Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 14, 111–36. Using Smart Source Parsing.
- [5] Müller, P., Rudin, D., Tien, H. and Wescott, W., **1963** Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solutions. *J. Phys. Chem.*, 67, 534–535.
- [6] Fuchs, H., **1993** Atomic force and scanning tunneling microscopies of organic surfaces. *J. Mol. Struct.*, 22, 29–47.
- [7] Terrettaz, S., Stora, T., Duschl, C. and Vogel, H., **1993** Protein binding to supported lipid membranes: Investigation of the cholera toxin-ganglioside interaction by simultaneous impedance spectroscopy and surface plasmon resonance. *Langmuir*, 9, 1361–1369.
- [8] Janshoff, A., Galla, H.-J. and Steinem, C., **2000** Mikrogravimetrische Sensoren in der Bioanalytik - eine Alternative zu optischen Biosensoren? *Angewandte Chemie*, 112(22), 4164–4195.

-
- [9] Wegener, J., Janshoff, A. and Steinem, C., **2001** The quartz crystal microbalance as a novel means to study cell-substrate interactions in situ. *Cell. Biochem. Biophys.*, 34, 121–151.
- [10] Blodgett, K., **1935** Films built by depositing successive monomolecular layers on a solid surface. *J Am Chem Soc*, 57, 1007–1022.
- [11] Langmuir, I. and Schäfer, V., **1938** Activities of Urease and Pepsin Monolayers. *J Am Chem Soc*, 60, 1351–1360.
- [12] Ulman, A., **1996** Formation and Structure of self-assembled monolayers. *Chem. Rev.*, 96, 1533–1554.
- [13] Plant, A., **1993** Self-assembled phospholipid/alkanethiol biomimetic bilayers on gold. *Langmuir*, 9, 2764–2767.
- [14] Florin, E. and Gaub, E., **1993** Painted supported lipid membranes. *Biophys J*, 64(2), 375–383.
- [15] Wiegand, G., Arribas-Layton, N., Hillebrandt, H., Sackmann, E. and Wagner, P., **2002** Electrical Properties of supported lipid bilayer membranes. *J. Phys. Chem. B*, 106, 4245–4254.
- [16] Cremer, P. and Boxer, S., **1999** Formation and spreading of lipid bilayers on planar glass supports. *J. Phys. Chem. B*, 103, 2554–2559.
- [17] Rapuano, R. and Carmona-Ribeiro, A., **1997** Physical adsorption of bilayer membranes on silica. *J. Colloid Interface Sci.*, 193, 104–111.
- [18] Jass, J., Tjarnhage, T. and Puu, G., **2000** From liposomes to supported, planar bilayer structures on hydrophilic and hydrophobic surfaces: an atomic force microscopy study. *Biophys J*, 79, 3153–3163.
- [19] Brian, A. and McConnell, H., **1984** Allogeneic stimulation of cytotoxic T cells by supported planar membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 6159–6163.

-
- [20] Tamm, L. and McConnell, H., **1985** Supported phospholipid bilayers. *Biophys J*, 47, 105–113.
- [21] Sackmann, E. and Tanaka, M., **2000** Supported membranes on soft polymer cushions: fabrication, characterization and applications. *TIBTECH*, 18, 58–64.
- [22] Elender, G., **1996** Functionalisation of Si/SiO₂ and glass surfaces with ultrathin dextran films and deposition of lipid bilayers. *Biosens. Bioelectron.*, 11, 565–577.
- [23] Wong, J., Majewski, J., Seitz, M., Park, C., Israelachvili, J. and Smith, G., **1999** Polymer-Cushioned Bilayers. I. A Structural Study of Various Preparation Methods Using Neutron Reflectometry. *Biophys J*, 77, 1445–1457.
- [24] Cassier, T., Sinner, A., Offenhäuser, A. and Möhwald, H., **1999** Homogeneity, electrical resistivity and lateral diffusion of lipid bilayers coupled to polyelectrolyte multilayers. *Colloids and Interfaces B: Biointerfaces*, 15, 215–225.
- [25] Cheng, Y., Ogier, S., Bushby, R. and Evans, S., **2000** Discrete membrane arrays. *Rev. in Mol. Biotech.*, 74, 159–174.
- [26] Raguse, B., Braah-Maksvytis, V., Cornell, B., King, L., Osman, P., Pace, R. and Wieczorek, L., **1998** Tethered Lipid Bilayer Membranes: Formation and Ionic Reservoir Characterization. *Langmuir*, 14, 648–659.
- [27] Cheng, Y., Bushby, R., Evans, S., Knowles, P., Miles, R. and Ogier, S., **2001** Single ionchannel sensitivity in suspended bilayers on micromachined supports. *Langmuir*, 17, 1240–1242.
- [28] Osborn, T. and Yager, P., **1995** Formation of planar solvent-free phospholipid bilayers by Langmuir-Blodgett transfer of monolayers to micromachined apertures in silicon. *Langmuir*, (11), 8–12.

-
- [29] Fertig, N., Tilke, A., Blick, R. and Kotthaus, J., **2000** Stable integration of isolated cell membrane patches in a nanomachined aperture. *Appl. Phys. Lett.*, 77(8), 1218–1220.
- [30] Mayer, M., Kriebel, J., Tosteson, M. and Whitesides, G., **2003** Microfabricated Teflon Membranes for Low-Noise Recordings of Ion Channels in Planar Lipid Bilayers. *Biophys J*, 85, 2684–2695.
- [31] Ikematsu, M., Iseki, M., Sugiyama, Y. and Mizukami, A., **1996** Lipid bilayer formation in amicroporous membrane filter monitored by ac impedance analysis and purple membrane photoresponses. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 403, 61–68.
- [32] Favero, G., D’Annibale, A., Campanella, L., Santucci, R. and Ferri, T., **2002** Membrane supported bilayer lipid membranes array: preparation, stability and ion-channel insertion. *Analytica Chimica Acta*, 460, 23–34.
- [33] Favero, G., Campanella, L., D’Annibale, A., Santucci, R. and Ferri, T., **2003** Mixed hybrid bilayer lipid membrane incorporating valinomycin: improvements in preparation and functioning. *Microchemical Journal*, 74, 141–148.
- [34] Römer, W. and Steinem, C., **2004** Impedance analysis and single-channel recordings on nano-black lipid membranes based on porous alumina. *Biophys J*, 86(2), 955–65.
- [35] Hennechal, C., Drexler, J. and Steinem, C., **2002** Membrane-suspended nanocompartments based on ordered pores in alumina. *Chemphyschem*, 3(10), 885–9.
- [36] Drexler, J. and Steinem, C., **2003** Pore-suspending lipid bilayers on porous alumina investigated by electrical impedance spectroscopy. *J. Phys. Chem. B*, 107, 11245–11254.
- [37] Römer, W., Lam, Y. H., Fischer, D., Watts, A., Fischer, W. B., Goring, P., Wehrspohn, R. B., Gosele, U. and Steinem, C., **2004** Channel activity of

- a viral transmembrane peptide in micro-BLMs: Vpu(1-32) from HIV-1. *J Am Chem Soc*, 126(49), 16267–74.
- [38] Drachev, L. A., Frolov, V. N., Kaulen, A. D., Liberman, E. A., Ostroumov, S. A., Plakunova, V. G., Semenov, A. Y. and Skulachev, V. P., **1976** Reconstitution of Biological Molecular generators of electric current: Bacteriorhodopsin. *J Biol Chem*, 251(22), 7059–65.
- [39] Bamberg, E., Apell, H.-J., Dencher, N., Sperling, W., Stieve, H. and Lauser, P., **1979** Photocurrents generated by bacteriorhodopsin on planar bilayer membranes. *Biophys. Struct. Mech.*, 5, 277–292.
- [40] Herrmann, T. R. and Rayfield, G. W., **1978** The electrical response to light of bacteriorhodopsin in planar membranes. *Biophys J*, 21(2), 111–25.
- [41] Ganea, C., Tittor, J., Bamberg, E. and Oesterhelt, D., **1998** Chloride- and pH-dependent proton transport by BR mutant D85N. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1368, 84–96.
- [42] Bamberg, E., Hegemann, P. and Oesterhelt, D., **1984** Reconstitution of the light driven electrogenic ion pump halorhodopsin in black lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 773, 53–60.
- [43] Seifert, K., Fendler, K. and Bamberg, E., **1993** Charge transport by ion translocating membrane proteins on solid supported membranes. *Biophys. J.*, 64, 384–391.
- [44] Puu, G., Gustafson, I., Artursson, E. and Ohlsson, P. A., **1995** Retained activities of some membrane proteins in stable lipid bilayers on a solid support. *Biosens Bioelectron*, 10(5), 463–76.
- [45] Moran, A., Tal, E., Eytan, E. and Nelson, N., **1980** Study of proton pumps by phospholipid-impregnated millipore filters. *Febs Letters*, 110(1), 62–64.
- [46] Burzik, C., Kaim, G., Dimroth, P., Bamberg, E. and Fendler, K., **2003** Charge Displacements during ATP-Hydrolysis and Synthesis of the Na⁺-

- Transporting F0F1-ATPase of *Ilyobacter tartaricus*. *Biophys J*, 85, 2044–2054.
- [47] Folgering, J., Kuiper, J., de Vries, A., Engberts, J. and Poolman, B., **2004** Lipid-Mediated Light Activation of a Mechanosensitive Channel of Large Conductance. *Langmuir*, 20, 6985–6987.
- [48] Bennett, I. M., Farfano, H. M., Bogani, F., Primak, A., Liddell, P. A., Otero, L., Sereno, L., Silber, J. J., Moore, A. L., Moore, T. A. and Gust, D., **2002** Active transport of Ca^{2+} by an artificial photosynthetic membrane. *Nature*, 420(6914), 398–401.
- [49] Benkoski, J., Jesorka, A., Kasemo, B. and Höök, F., **2005** Light-Activated Desorption of Photoactive polyelectrolytes from Supported Lipid Bilayers. *Macromolecules*, 38, 3852–3860.
- [50] Shen, Y., Safinya, C., Liang, K., Ruppert, A. and Rothschild, K., **1993** Stabilization of the membrane protein bacteriorhodopsin to 140° C in two-dimensional films. *Nature*, 48, 366.
- [51] Oesterhelt, D. and Stoeckenius, W., **1971** Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nat New Biol*, 233(39), 149–52.
- [52] Römer, W., **2004** *Impedance analysis and single channel recordings on pore-suspending lipid bilayers based on highly ordered pore arrays*. Dissertation, Universität Regensburg.
- [53] Henderson, R. and Unwin, P., **1975** Three-dimensional model of the purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature*, 257, 28–32.
- [54] He, J.-A., Samuelson, L., Li, L., Kumar, J. and Tripathy, S., **1998** Oriented Bacteriorhodopsin/Polycation Multilayers by Electrostatic Layer-by-Layer Assembly. *Langmuir*, 14, 1674–1679.
- [55] Hampp, N., **2000** Bacteriorhodopsin as a Photochromic Retinal Protein for Optical Memories. *Chem. Rev.*, 100, 1755–1776.

- [56] Bräuchle, C., Hampp, N. and Oesterhelt, D., **1991** Optical Applications of Bacteriorhodopsin and its Mutated Variants. *Adv. Mater.*, 3(420-428).
- [57] Hegemann, P. and Fischer, M., **1999** Algal Eyes. In *Nature Encyclopedia of Life Science*. John Wiley & Sons, Chichester.
- [58] Foster, K., Saranak, J., Patel, N., Zarilli, G., Okabe, M., Kline, T. and Nakanishi, K., **1984** A rhodopsin is the functional photoreceptor for phototaxis in the unicellular eukaryote *Chlamydomonas*. *Nature*, 311(84), 756–759.
- [59] Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., Kateriya, S., Musti, A., Bamberg, E. and Hegemann, P., **2002** Channelrhodopsin-1: a light gated proton channel in green algae. *Science*, 296, 2395–2398.
- [60] Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., Ollig, D., Hegemann, P. and Bamberg, E., **2003** Channelrhodopsin-2: a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 13940–13945.
- [61] Ende, D. and Mangold, K.-M., **1993** Impedanzspektroskopie. *Chem. in unserer Zeit*, 27, 134–140.
- [62] Yun, K., Kobatake, E., Haruyama, T., Laukkanen, M.-L., Keinänen, K. and Aizawa, M., **1998** Use of a Quartz Crystal Microbalance To Monitor Immunoliposome-Antigen Interaction. *Analytical Chemistry*, 70, 260–264.
- [63] Steinem, C., Janshoff, A., Wegener, J., Ulrich, W.-P., Willenbrink, W., Sieber, M. and Galla, H.-J., **1997** Impedance and shear wave resonance analyses of ligand-receptor interactions at functionalized surfaces and of cell monolayers. *Biosensors & Bioelectronics*, 12(8), 787–808.
- [64] Reiss, B., Janshoff, A., Steinem, C., Seebach, J. and Wegener, J., **2003** Adhesion Kinetics of Functionalized Vesicles and Mammalian Cells: A Comparative Study. *Langmuir*, 19, 1816–1823.
- [65] Muratsugu, M., Ohta, F., Miya, Y., Hosokawa, T., Kurosawa, S., Kamo, N. and Ikeda, H., **1993** Quartz Crystal Microbalance for the Detection

- of Microgram Quantities of Human Serum Albumin: Relationship between the Frequency Change and the Mass of Protein Adsorbed. *Analytical Chemistry*, 65, 2933–2937.
- [66] Kumar, A., **2000** Biosensors Based on Piezoelectric Crystal Detectors: Theory and Application. *The Member Journal of The Minerals, Metals & Materials Society*, 52(10).
- [67] Janshoff, A., Steinem, C., Sieber, M. and Galla, H.-J., **1996** Specific binding of peanut agglutinin to GM1-doped solid supported lipid bilayers investigated by shear wave resonator measurements. *European Biophysical Journal*, 25, 105–113.
- [68] Ebato, H., Gentry, C. A., Herron, J. N., Müller, W., Okahata, Y., Ringsdorf, H. and Suci, P. A., **1994** Investigation of Specific binding of Antifluorescyl Antibody and Fab to Fluorescein Lipids in Langmuir-Blodgett Deposited Films Using Quartz Crystal Microbalance Methodology. *Analytical Chemistry*, 66, 1683 – 1689.
- [69] Buttry, D. A. and Ward, M. D., **1992** Measurement of Interfacial Processes at Electrode Surfaces with the Electrochemical Quartz Crystal Microbalance. *Chemical Reviews*, 92, 1355–1379.
- [70] Schumacher, R., **1990** Die Quarzmikrowaage: Eine neue Meßtechnik zur in-situ-Untersuchung des Phasengrenzbereiches fest/flüssig. *Angewandte Chemie*, 102(4), 347–460.
- [71] Kanazawa, K. K. and Gordon, J. G., **1985** Frequency of a Quartz Microbalance in Contact with Liquid. *Analytical Chemistry*, 57, 1770–1771.
- [72] Rodahl, M., Höök, F., Fredriksson, C., Keller, C. A., Krozer, A., Brzezinski, P., Voinova, M. and Kasemo, B., **1997** Simultaneous frequency and dissipation factor QCM measurements of biomolecular adsorption and cell adhesion. *Faraday Discuss.*, 107, 229–246.

- [73] Rodahl, M. and Kasemo, B., **1996** Frequency and dissipation-factor responses to localized liquid deposits on a QCM electrode. *Sensors and Actuators B*, 37, 111–116.
- [74] Rodahl, M., Höök, F., Krozer, A., Brzezinski, P. and Kasemo, B., **1995** Quartz crystal microbalance setup for frequency and Q-factor measurements in gaseous and liquid environments. *Review of Scientific Instruments*, 66(7), 3924–3930.
- [75] Rodahl, M., Höök, F. and Kasemo, B., **1996** QCM Operation in Liquids: An Explanation of Measured Variations in Frequency and Q Factor with Liquid Conductivity. *Analytical Chemistry*, 68(13), 2219–2227.
- [76] Rodahl, M. and Kasemo, B., **1996** A simple setup to simultaneously measure the resonant frequency and the absolute dissipation factor of a quartz crystal microbalance. *Review of Scientific Instruments*, 67(9), 3238–3241. Only Abstract.
- [77] Adair, W., Steinmetz, S., Mattson, D., Goodenough, U. and Heuser, J., **1987** Nucleated assembly of Chlamydomonas and Volvox cell walls. *J. Cell Biol.*, 105(87), 2373–2383.
- [78] Sueoka, N., Chiang, K. and Kates, J., **1967** Deoxyribonucleic acid replication in meiosis of Chlamydomonas reinhardtii. I. Isotopic transfer experiments with a strain producing eight zoospores. *J. Mol. Biol.*, 25(67), 47–66.
- [79] Hutner, S., Provasoli, L., Schatz, A. and Haskins, C., **1950** Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms. *Proc. Am. Phil. Soc.*, 94(50), 152–170.
- [80] Jessensky, O., **1997** *Untersuchungen zum Porenwachstum in 6H-Siliziumkarbid und anodischem Aluminiumoxid*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle.
- [81] Jessensky, O., Müller, F. and Gösele, U., **1998** Self-organized formation of hexagonal pore arrays in anodic alumina. *Appl. Phys. Lett.*, 72, 1173–1175.

- [82] Masuda, H. and Fukuda, K., **1995** Ordered metal nanohole arrays made by a two-step replication of honeycomb structures of anodic alumina. *Science*, 268, 1466–1468.
- [83] Li, A., Müller, F., Birner, A., Nielsch, K. and Gösele, U., **1998** Hexagonal pore arrays with 50-420 nm interpore distance formed by self-organization in anodic alumina. *J. Appl. Physics*, 84, 6023–6026.
- [84] Jessensky, O., Müller, F. and Gösele, U., **1998** Self-organized formation of hexagonal pore structures in anodic alumina. *J. Electrochem. Soc.*, 145, 3735–3740.
- [85] Nielsch, K., Müller, F., Li, A. and Gösele, U., **2000** Uniform nickel deposition into ordered alumina pores by pulsed electrodeposition. *Adv. Mater.*, 12(8), 582–586.
- [86] Rigaud, J., Bluzat, A. and Buschlen, S., **1983** Incorporation of bacteriorhodopsin into large unilamellar liposomes by reversed phase evaporation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 111, 373–382.
- [87] Khorana, H. G., Gerber, G. E., Herlihy, W. C., Gray, C. P., Anderegg, R. J., Nihei, K. and Biemann, K., **1979** Amino acid sequence of bacteriorhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(10), 5046–50.
- [88] Ovchinnikov, Y., **1974** *Membrane active complexons*. Elsevier, New York.
- [89] Kates, M., Kushwaha, C., S. and Sprott, D., G., **1982** Lipids of purple membrane from extreme halophils and of methanogenic bacteria. In *Methods in enzymology* 88. Academic Press, New York.
- [90] Renthall, R. and Cha, C. H., **1984** Charge asymmetry of the purple membrane measured by uranyl quenching of dansyl fluorescence. *Biophys J*, 45(5), 1001–6.
- [91] Steinem, C., **1997** *Ionentransport in festkörperunterstützten Lipiddoppelschichten*. Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster.

-
- [92] Drexler, J., **2003** *Herstellung porenüberspannender Lipidmembranen auf Basis poröser Aluminate und deren Charakterisierung mittels elektrischer Impedanzspektroskopie*. Dissertation, Universität Regensburg.
- [93] Decher, G., **1997** Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science*, 277, 1232.
- [94] Lvov, Y., **2002** *Handbook for Surfaces and Interfaces*. Thin film nanofabrication by alternate adsorption of polyions, proteins and nanoparticles. Academic Press, New York.
- [95] Krasemann, L. and Tieke, B., **1999** Composite membranes with ultrathin separation layer prepared by self-assembly of polyelectrolytes. *Materials Science and Engineering*, C 8-9, 513–518.
- [96] Harris, J., **2000** Layered polyelectrolyte films as selective, ultrathin barriers for anion transport. *Chem. Mater.*, 12, 1941–46.
- [97] Xiao, K., Harris, J., Park, A., Martin, C., Pradeep, V. and Bruening, M., **2001** Formation of ultrathin defect-free membranes by grafting of poly(acrylic acid) onto layered polyelectrolyte films. *Langmuir*, 17, 8236–8241.
- [98] Horn, C., **2001** *Untersuchung der Aktivität von Bacteriorhodopsin immobilisiert auf selbstorganisierten Polyelektrolyt-Schichten*. Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster.
- [99] Keller, C. A. and Kasemo, B., **1998** Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance. *Biophys J*, 75(3), 1397–1402.
- [100] Faiss, S., Luthgens, E. and Janshoff, A., **2004** Adhesion and rupture of liposomes mediated by electrostatic interaction monitored by thickness shear mode resonators. *Eur Biophys J*, 33(6), 555–61.
- [101] Le Blanc, O., **1971** Effect of uncouplers of oxidative phosphorylation on bilayer membranes: Carbonylcyanide-m-chlorophenylhydrazone. *J. Membr. Biol.*, 4, 227–251.

- [102] Bamberg, E., Dencher, N., Fahr, A. and Heyn, M., **1981** Transmembraneous incorporation of photoelectrically active bacteriorhodopsin in planar lipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78(2), 7502–7506.
- [103] Steinem, C., Janshoff, A., Höhn, F., Sieber, M. and Galla, H.-J., **1997** Proton translocation across bacteriorhodopsin containing solid supported lipid bilayers. *Chem. Phys. Lipids*, 89, 141–152.
- [104] Dolfi, A., Tadini-Buoninsegni, F., Moncelli, M. R. and Guidelli, R., **2002** Photocurrents Generated by Bacteriorhodopsin Adsorbed on Thiol/Lipid Bilayers Supported by Mercury. *Langmuir*, 18, 6345–6355.
- [105] Kim, D., Han, S., Kim, C., Hong, J. and Kim, K., **1999** Morphology of multilayers assembled by electrostatic attraction of oppositely charged model polyelectrolytes. *Thin Solid Films*, 350, 153–160.
- [106] He, J.-A., Samuelson, L., Li, L., Kumar, J. and Tripathy, S. K., **1998** Photoelectric Properties of Oriented Bacteriorhodopsin/Polycation Multilayers by Electrostatic Layer-by-Layer Assembly. *J. Phys. Chem. B*, 102, 7067–7072.
- [107] Lösche, M., Schmitt, J., Decher, G., Bouwman, W. and Kjaer, K., **1998** Detailed Structure of Molecularly Thin Polyelectrolyte Multilayer Films on Solid Substrates as Revealed by Neutron Reflectometry. *Macromolecules*, 31, 8893–8906.
- [108] Baur, J., Rubner, M., Reynolds, J. and Kim, S., **1999** Förster Energy Transfer Studies of Polyelectrolyte Heterostructures Containing Conjugated Polymers: A Means To Estimate Layer Interpenetration. *Langmuir*, 15, 6460–6469.
- [109] Schlenoff, J., Ly, H. and Li, M., **1998** Charge and Mass Balance in Polyelectrolyte Multilayers. *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 7626–7634.

-
- [110] Reviakine, I. and Brisson, A., **1999** Formation of Supported Phospholipid Bilayers from Unilamellar Vesicles Investigated by Atomic Force Microscopy. *Langmuir*, 16(4), 1806–1815.
- [111] Zhang, L., Longo, M. and Stroeve, P., **2000** Mobile Phospholipid Bilayers Supported on a Polyion/Alkylthiol Layer Pair. *Langmuir*, 16, 5093–5099.
- [112] Hertz, G., Braun, B., Müller, K. and Maurer, R., **1987** What is the Physical Significance of the Pictures Representing the Grotthus H^+ Conductance Mechanism? *Journal of Chemical Education*, 64(9), 777–784.
- [113] Tien, H. and Ottowa, A., **2000** *Membrane biophysics: planar lipid bilayers and spherical liposomes*. Elsevier, New York.
- [114] Schmidt, C., Mayer, M. and Vogel, H., **2000** A Chip-Based Biosensor for the Functional Analysis of Single Ion Channels. *Angew Chem Int Ed Engl*, 39(17), 3137–3140.
- [115] Müller, d. J., Schabert, F. A., Bueldt, G. and Engel, A., **1995** Imaging purple membranes in aqueous solutions at sub-nanometer resolution by atomic force microscopy. *Biophys. J.*, 68, 1681–1686.
- [116] Hufnagel, P., **1993** *Messung der Photoströme von Chlamydomonas-Zellen an planaren Lipidmembranen*. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- [117] Kateriya, S., Nagel, G., Bamberg, E. and Hegemann, P., **2004** "Vision" in single-celled algae. *News Physiol Sci*, 19, 133–7.
- [118] Sineshchekov, O. A., Jung, K. H. and Spudich, J. L., **2002** Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(13), 8689–94.

8 Anhang

A1 Symbolverzeichnis

A	Fläche
C	Kapazität, Sauerbrey-Konstante
D	Dissipationsfaktor
G	Leitfähigkeit, Freie Enthalpie
I	Strom
J	Stromdichte
L	Lichtintensität, Induktivität
M	Molare Masse
Q	Ladung, Güte
R	Widerstand
V	Kapazität
Z	Impedanz
c	Konzentration
d	Dicke, Abstand
f	Frequenz
h	Plancksches Wirkungsquantum
m	Masse
r	Radius
s	Proportionalitätskonstante
t	Zeit
v	Geschwindigkeit
ϵ	Dielektrizitätskonstante

ϕ	Phasenwinkel
λ	Wellenlänge
μ	Schermodul
ρ	Dichte
σ	Konzentrationswiderstand
τ	Zeitkonstante
ω	Kreisfrequenz

A2 Abkürzungsverzeichnis

AC	<i>alternating current</i>
AFM	<i>Atomic Force Microscope</i>
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)-imino-tris(hydroxymethyl)-methan
BLM	schwarze Membranen (<i>black lipid membranes</i>)
CPE	<i>constant phase element</i>
d	Tage
DC	<i>Direct Current</i>
DPhPC	Diphytanoylphosphatidylcholin
DPPA	Dipalmitoylphosphatidylsäure
DPPE	Dipalmitoylphosphatidylthioethanol
EIS	<i>Electrical Impedance Spectroscopy</i>
h	Stunden
m	Membran
MEA	Mercaptoethylamin
min	Minuten
MUA	Mercaptoundecylamin
ODA	Octadecylamin
ODT	Octadecanthiol
PE	Polyelektrolyt

PEM	Polyelektrolyt-Multischichte(n)
s	Sekunden
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
wt	<i>weight</i>

A3 Chemikalien

Aceton	Merck (Darmstadt)
Agar	DIFCO Laboratories (Detroit, USA)
Asolectin	Fluka (Buchs, CH)
Argon	Linde (München)
Bis-Tris	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
CCCP	
Chloroform	Merck (Darmstadt)
Chrom(VI)-Oxide	Merck (Darmstadt)
n-Dekan	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
DPhPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DPPA	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DPSTE	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
Ethanol	Fluka (Neu-Ulm)
Fleischpepton, neutral	
tryptisch verdaut	Oxoid (Basingstoke, UK)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Mercaptoethansulfonsäure	Fluka (Buchs, CH)
Mercaptoethylamin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
11-Mercaptoundekylamin	Probiol (München)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Mucosol	Merck (Darmstadt)
Natriumsulfat	Merck (Darmstadt)
ODA	

ODT	Merck-Schuchardt (Hohenbrunn)
Oxalsäure	Merck (Darmstadt)
<i>ortho</i> -Phosphorsäure, 85%	Merck (Darmstadt)
Polydiallyldimethylammonium- chlorid	Aldrich (Steinheim)
Polyethylenimin	Aldrich (Steinheim)
Polystyrolsulfonsäure	Aldrich (Steinheim)
Quecksilber(II)-Chlorid	Merck (Darmstadt)
Schwefelsäure, 95-97%	Merck (Darmstadt)
Stickstoff	Linde (München)
Tris	USB (Cleveland, USA)

A4 Materialien

Aluminium	Goodfellow (Huntingdon, UK)
Gold	Elektronen Optik Service (Dortmund)
Kalrez® O-Ringe	DuPont Dow Elast. (Newark, USA)
Platindraht	Goodfellow (Huntingdon, UK)

A5 Geräte

Ätzapparatur

Keithley 2400 Source Meter	Keithley Instr. (Cleveland, USA)
Tektronix PS 280 DC Power Supply	Tektronix Inc. (Beaverton, USA)
Tektronix Power Supply EA-PS 9300-02	Tektronix Inc. (Beaverton, USA)
Ecoline RE 104	Lauda GmbH (Königshofen)

Impedanzspektroskopie

Impedance/Gain-Phase Analyzer SI 1260	Solartron Instr. (Farnborough, UK)
1296 Dielectric Interface	Solartron Instr. (Farnborough, UK)

Strommeßgerät

Halogenlampe, 250 W

Opto Sonderbedarf GmbH
(München)

Lichtleiter

Opto Sonderbedarf GmbH
(München)

A/D-Wandler-Karte

National Instruments (München)

OG 515-Kantenfilter

AHF Analysentechnik (Tübingen)

Interferenz-Bandfilter

ITOS GmbH (Mainz)

Sonstige Geräte

Q-CMD

Eigenbau, AK Steinem

pH-Meter Knick 761 *Calimatic*

Knick (Berlin)

Plasma Cleaner PDC 32G-2

Harrick (New York, USA)

Sputter coater 108 auto

Cressington (Watford, USA)

Thickness Controller mtm 20

Cressington (Watford, USA)

Ultraschallbad Bandelin Sonorex

RK 255 H

Bandelin Electronic (Berlin)

Reinstwasseranlage

MilliQ RO 10 Plus

MilliQ plus 185

Millipore (Eschborn)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle

- Frau Prof. Dr. Claudia Steinem für die Bereitstellung des interessanten Themas, die hervorragende Betreuung, die stete Diskussionsbereitschaft und die uneingeschränkte Unterstützung dieser Arbeit.
- Herrn Prof. Dr. Peter Hegemann für die Möglichkeit, die molekularbiologischen Ressourcen seines Labors zu nutzen und
- seinen Mitarbeitern Tina Schiereis, Sabine Ehlenbeck und Peter (Berti) Berthold für die Hilfe bei der Isolierung von Purpurmembranen und der Vorbereitung der *Chlamys*, für die Bereitstellung von Leuchtdioden, Bandfiltern. . .
- der DFG, die diese Arbeit im Rahmen des Graduiertenkollegs *sensory photoreceptors in natural and artificial systems* finanziell unterstützt hat.
- den Forschungspraktikanten, insbesondere Eva Schmitt und Martin Link, für ihre Mithilfe und reges Interesse.
- den Mitarbeitern der Feinmechanik- und Elektronik-Werkstatt, die die „ganz dringenden“ Aufträge auch immer so behandelt haben.
- allen meinen Laborkollegen für die das angenehme Arbeitsklima, die unterhaltsamen Kaffeepausen und die abendlichen „Messungen“.
- meinen Freunden Alex, Martin und JD, deren Freundschaft auch unter der großen Entfernung nicht gelitten hat.
- natürlich auch bei meinen Eltern, deren Unterstützung ich mir immer sicher sein konnte.

Und ganz besonders bei meiner Freundin Manuela: DANKE!

Lebenslauf

Name	Christian Horn
geboren	07.07.1975 in Warendorf
Schulbildung	08/1982 - 07/1986 Grundschule Sassenberg 08/1986 - 06/1995 Gymnasium Laurentianum Warendorf
Wehrdienst	07/1995 - 09/1995 Grundausbildung zum Sanitäter an der Marineversorgungsschule List/Sylt 10/1995 - 06/1996 Labor- und administrative Tätigkeiten am Sportmedizinischen Institut der Bundeswehrsportschule Warendorf
Studium	10/1996 - 09/2001 Studium der Chemie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster <u>22.10.1998 Vordiplom im Fach Chemie</u> 04/2000 - 10/2000 Auslandsstudium an der University of California, Santa Barbara 04/2001 - 09/2001 Diplomarbeit am Institut für Biochemie, Uni Münster unter Anleitung von Prof. Dr. C. Steinem <u>28.09.2001 Diplom im Fach Chemie</u>
Tätigkeiten	04/2001 - 09/2001 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Biochemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster 12/2001 - 05/2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik, Universität Regensburg
Förderungen	10/2003 - 05/2005 Stipendiat und stud. Sprecher des Graduiertenkollegs GRK 640 <i>Sensory photoreceptors in natural and artificial systems</i> der Deutschen Forschungsgemeinschaft
Dissertation	Beginn der Dissertation am 1.12.2001 am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik, Uni Regensburg unter der Anleitung von Prof. Dr. C. Steinem

Veröffentlichungen

Publikation

Horn, C., Steinem, C. **2005** Photocurrents Generated By Bacteriorhodopsin Adsorbed On Nano-Black Lipid Membranes. *Biophys. J.* (accepted)

Posterpräsentationen

Polyelectrolyte layers as support for artificial lipid membranes
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik/NanoBio Tec, September 2001, Münster

Activity of Bacteriorhodopsin on solid supported polyelektrolyte cushions
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik, September 2002, Dresden

Activity of bacteriorhodopsin on porous substrates
Summer School GK „Sensory photoreceptors in natural and artificial systems“, Juli 2003, Frauenchiemsee

Purple membranes adsorbed on nano-BLM-covered porous alumina
Summer School GK „Sensory photoreceptors in natural and artificial systems“, Juli 2004, Regen

Purple membranes adsorbed on nano-BLMs
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik, September 2004, Freiburg